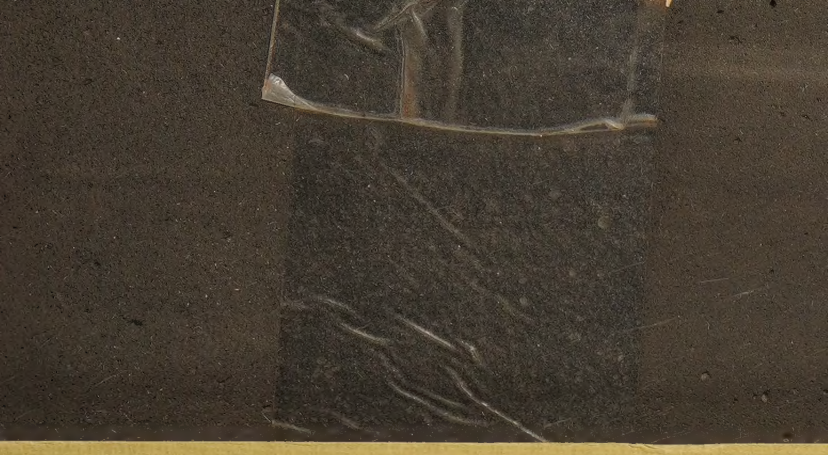


DIE EXPRESSION DER KOLLAGENGENE IN EMBRYONALEN CHONDROCYTEN

Michael Duchêne

Diss
München

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546814_0019

DIE EXPRESSION DER KOLLAGENGENE IN EMBRYONALEN CHONDROCYTEN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig - Maximilians - Universität

München

vorgelegt von

Diplom - Chemiker Michael Duchêne

München 1984

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Kühn

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Ernst Ludwig Winnacker

Tag der Einreichung der Arbeit: 26.1.1984

Tag der mündlichen Prüfung: 15.5.1984

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Kollagene Proteine

1.1.1. Struktur 1

1.1.2. Biosynthese 4

1.1.3. Polymorphismus 6

1.1.4. Genomstruktur 8

1.2. Chondrocyten, ein System zum Studium der Genexpression von Eukaryonten

1.2.1. Der Chondrocyt in seiner physiol. Funktion 9

1.2.2. Die Umschaltung der Chondrocyten in Zellkultur 10

1.2.3. Die Beeinflussung der Umschaltgeschwindigkeit 12

1.2.4. Medizinische Bedeutung des Umschaltvorgangs 12

1.3. Genregulation bei Eukaryonten- Studium der Kollagensynthese mit molekularbiologischen Methoden

1.3.1. Transkriptionskontrolle der Kollagensynthese 14

1.3.2. Translationskontrolle der Kollagensynthese 15

1.3.3. Untersuchungen am Chondrocytensystem auf der Ebene der Nukleinsäuren 16

2. Aufgabenstellung 18

3. Ergebnisse

3.1. Biochemische und zellbiologische Untersuchungen am Chondrocytensystem

3.1.1. Umschaltung der Chondrocyten- morphologische Untersuchung 20

3.1.2. Bestimmung des Anteils von Typ I Kollagen an der Kollagensynthese von umschaltenden Chondrocyten 23

3.1.3. Charakterisierung eines Faktors aus konditioniertem Medium von embryonalen Hühnerkalvarien, der die Dedifferenzierung von Chondrocyten beschleunigt 24

3.2. Untersuchung der Kollagen mRNA im Verlauf der Dedifferenzierung von Chondrocyten- zellfreie Translation

3.2.1. RNA- Präparation 31

3.2.2. Vorversuche für die zellfreie Translation 34

3.2.3. Identifizierung der Kollagenbanden 37

3.2.4. Die Umschaltung der Chondrocyten während längerer Kulturdauer- Verfolgung der mRNA- Mengenverhältnisse durch zellfreie Translation 40

3.2.5. Die Beschleunigung der Umschaltung durch das Agens Bromodeoxyuridin (BrdUrd) 42

3.3. Untersuchung der Kollagen mRNA im Verlauf der Dedifferenzierung von Chondrocyten, DNA - RNA Hybridisierung

3.3.1. Vorexperimente 44

3.3.2. Hauptexperiment: Hybridisierung von kollagenspezifischer cDNA zu Chondrocyten RNA Präparationen 48

3.4. Charakterisierung eines cDNA Klons (p550) aus mRNA von Knorpelgewebe

3.4.1. Gewinnung des Klons p550 53

3.4.2. Amplifizierung des Plasmids p550 55

3.4.3. Gewinnung von DNA- Bruchstücken für die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert 57

3.4.4. DNA- Sequenzierung am cDNA Klon p550 58

3.4.5. Untersuchung der Leserichtung der cDNA von p550 durch cDNA- mRNA Hybridisierung und S1- Nuklease-verdauung 65

3.4.6. Vergleich der p550 Sequenz mit der Dayhoff- Datenbank von bekannten Protein- und Nukleinsäuresequenzen 67

4. Diskussion

4.1. Wahl des Versuchssystems 69

4.2. Untersuchung eines Faktors in konditioniertem Medium von Kalvarien, der die Umschaltung der Kollagensynthese in Chondrocyten beschleunigt 69

4.3. Biosynthese des Kollagens bei Chondrocyten, die Ebene des Proteins 73

4.4. Die Umschaltung der Kollagensynthese bei Chondrocyten. Die Ebene der mRNA untersucht durch zellfreie Translation 75

4.5. Die Umschaltung der Kollagensynthese bei Chondrocyten. Die Ebene der mRNA untersucht durch mRNA- cDNA Hybridisierung (Northern Hybridisierung) 77

4.6. Charakterisierung des cDNA Klons p550 80

4.7. Medizinische Bedeutung der Ergebnisse 81

Zusammenfassung 83

5. Materialien und Methoden

5.1. Materialien 85

5.2. Methoden

5.2.1. Biochemische und zellbiologische Methoden zur

Charakterisierung des Chondrocytensystems 86

5.2.2. Methoden zur Untersuchung von Prokollagen mRNA von Chondrocyten 91

5.2.3. Methoden zur Charakterisierung des Plasmids p550 100

Abkürzungen 112

Literatur 113

Danksagung 125

1. Einleitung

In höheren Organismen muß jedes Gewebe spezifische Funktionen erfüllen. Diese Arbeit befaßt sich mit den Zellen, die Knorpelgewebe bilden, den Chondrocyten. Frisch isolierte Chondrocyten können in Zellkultur die Syntheseprodukte bilden, die für die Funktion des Knorpels notwendig sind. Nach längerer Kulturdauer verlieren sie diese Fähigkeit. Insbesondere schalten sie die Produktion des Knorpelkollagens (Typ II) ab und dafür die Produktion des Typ I Kollagens ein, das in Knorpel normalerweise nicht vorkommt. Diese Dedifferenzierung der Chondrocyten ist ein Phänomen, das auf der Ebene der Biosynthese des Kollagens gut untersucht ist. Diese Arbeit sollte mit Hilfe der molekularbiologischen Methoden, die in den letzten zehn Jahren entwickelt worden waren, die Produktion der Kollagen mRNAs im Vergleich zur Biosynthese des Kollagens untersuchen. So sollte für das System der Chondrocyten ein Beitrag zu der Frage der Regulation der Proteinsynthese geleistet werden.

1.1. Kollagene Proteine

1.1.1. Struktur

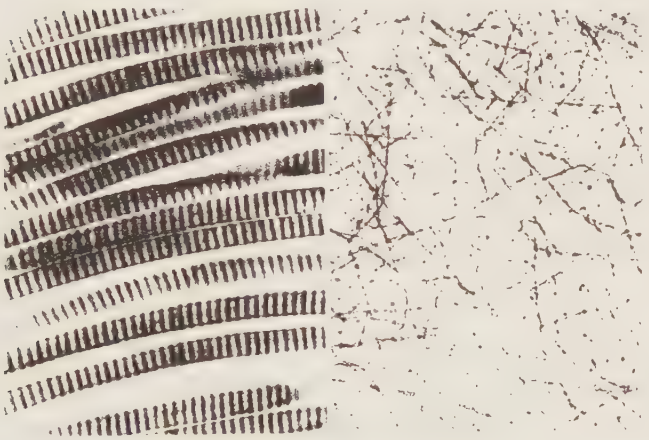
Als Kollagene bezeichnet man eine Gruppe von eng verwandten Proteinen des Bindegewebes, die bei Säugetieren etwa 30 % des Gesamtkörperproteins ausmachen und eine besondere Struktur besitzen (1). Das Typische der Struktur ist das Zusammentreten von drei Polypeptidketten zu einer Tripelhelix. Im Fall von Typ I Kollagen treten zwei α1(I) Ketten

und eine $\alpha 2(I)$ Kette von je etwa 1000 Aminosäuren zusammen und bilden ein Molekül von etwa 300 nm Länge und 1.4 nm Durchmesser (2,3).

Die Polypeptidketten haben eine Primärstruktur, die angenähert mit der Formel $(Gly - X - Y)_{338}$ beschrieben werden kann, in der X und Y für andere Aminosäuren als Glycin stehen (2,3). Die Besetzung jeder dritten Position durch Glycin ist notwendig, weil jede dritte Position im Inneren der Tripelhelix zu liegen kommt, wo nur für die kleinste Aminosäure Glycin Platz ist (2,3). Die Struktur $(Gly - X - Y)_n$ wird spezifisch von bakteriellen Kollagenasen erkannt und in Oligopeptidbruchstücke gespalten, was zur Erkennung kollagener Sequenzen benutzt werden kann (4). Die tripelhelikale Struktur kollagener Proteine wird durch die Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin stabilisiert. In Säugetieren und Vögeln sind etwa 100 der Positionen X Prolin und etwa 100 der Positionen Y Hydroxyprolin (2,3). Die Iminosäuren versteifen die Polypeptidketten und tragen so zur Stabilität der Tripelhelix bei. Die Hydroxylierung der Prolinreste in der Position Y hat einen weiteren stabilisierenden Effekt, der sich in einer Erhöhung der Schmelztemperatur der Tripelhelix äußert (5).

Etwa zwei Drittel der Positionen X und Y werden von Aminosäuren besetzt, deren Eigenschaften für die Organisation der Kollagenmoleküle auf der nächsthöheren Ebene wichtig sind. Die tripelhelikalen Moleküle lagern sich in einer Weise aneinander, daß die elektrostatischen und

hydrophoben Wechselwirkungen maximal sind. So bilden sich Fibrillen (siehe Abb. 1), die im elektronenmikroskopischen Bild eine typische Querstreifung mit einer Periode D = 67 nm aufweisen (6,7).



A B

Abb.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kollagenfibrillen, Vergrößerung 30000fach

A: Fibrillen von Typ I Kollagen in Haut (Kalb)

B: Fibrillen von Typ II Kollagen in Knorpel (embryonales Huhn)

Die Fibrillenstruktur wird durch Quervernetzung der Kollagenmoleküle stabilisiert. Dazu ist die Oxidation von Lysylresten des Kollagens notwendig. Die entstehenden Aldehydgruppen bilden Schiffsche Basen mit gegenüber-

liegenden Lysylresten. Diese Schiffschen Basen können sich durch Umlagerung stabilisieren, wenn einer der reagierenden Lysylreste hydroxyliert ist (8). Die Dicke und Anordnung der Fibrillen ist bei jedem Kollagentyp unterschiedlich, wobei bis heute nicht geklärt ist, ob sich die makroskopische Struktur aus der Aminosäuresequenz der Kollagenmoleküle allein erklärt oder im Gewebe durch andere Makromoleküle wie zum Beispiel durch Proteoglycane mitbestimmt wird.

1.1.2. Biosynthese des Kollagens (Abb. 2)

An den Ribosomen wird das Kollagen in einer Vorläuferform (Präprokollagen) synthetisiert und ins endoplasmatische Retikulum sezerniert. Dabei verliert das Präprokollagen sein hydrophobes Signalpeptid (9). Es entsteht eine Prokollagen- Polypeptidkette. Sie enthält einen zentralen Teil, der die Tripelhelix bilden wird und am N- und C- terminalen Ende globuläre Bereiche von 150 bzw. 250 Aminosäuren (2,3). Schon während der Translation beginnen posttranslationale Modifikationen der entstehenden Polypeptidkette. So hydroxylieren die Enzyme Prolylhydroxylase (10, 11, 12) und Lysylhydroxylase (10, 13) einen Teil der Prolyl- und Lysylreste. Einige der Hydroxylysylreste werden später mit Galactosyl- und Glucosylgalactosylgruppen glycosyliert (14, 15, 16). Die in dieser Weise modifizierten Polypeptidketten lagern sich nun zum tripelhelikalen Prokollagenmolekül zusammen. Dieses wird aus der Zelle ausgeschleust. Bei der Ausschleusung oder im Extra-

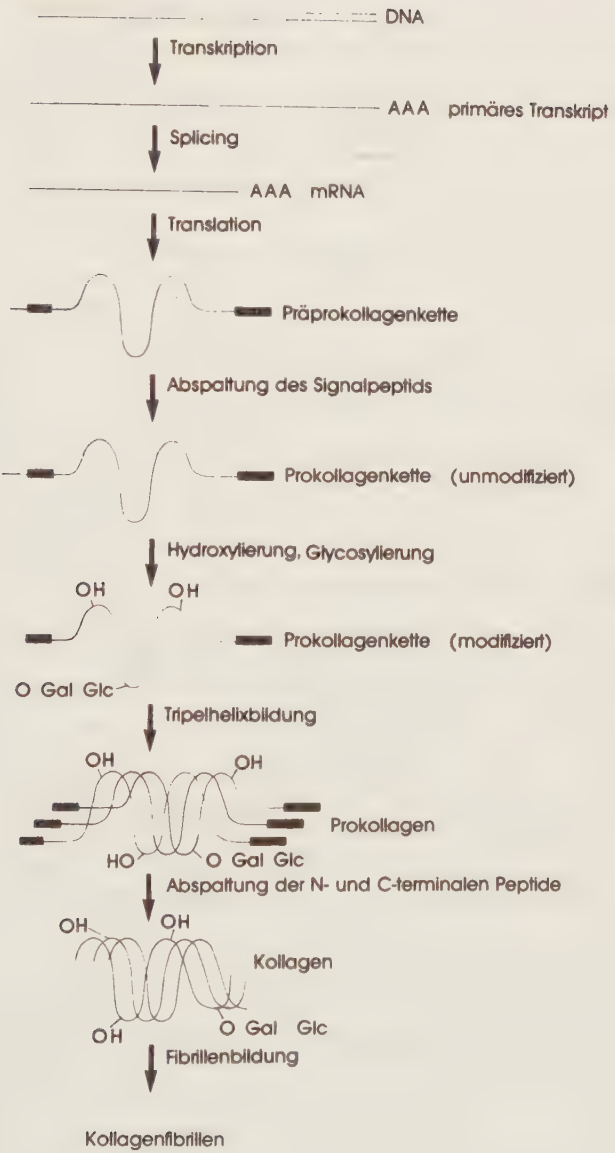


Abb.2: Biosynthese des Kollagens

zellulärraum spalten spezifische Prokollagen N- und C-Proteasen die endständigen Prokollagenpeptide ab (17, 18). Die reifen Kollagenmoleküle lagern sich nun zu Fibrillen zusammen und werden quervernetzt.

1.1.3. Polymorphismus des Kollagens

Tabelle 1 zeigt die wichtigsten bis heute gefundenen Kollagentypen. Typ I bis Typ III Kollagen werden als die interstitiellen Kollagene bezeichnet. Typ I Kollagen ist das wichtigste Bindegewebsprotein von Haut, Knochen und Sehnen (3). Die zwei α1(I) Ketten und die α2(I) Kette, die Typ I Kollagen aufbauen, sind gleich lang, haben aber verschiedene Ladungseigenschaften. Eine geringe Menge von einem Kollagen aus drei α1(I) Ketten ist in Sehnen und Kalvarien von Hühnerembryonen gefunden worden (19) und wird in vitro von Tumorzellen (20) aber auch Kaninchen (21) - und Hühnerchondrocyten (22) gebildet. Typ II Kollagen besteht aus drei identischen α1(II) Ketten und wurde hauptsächlich in Knorpelgewebe, aber auch in Kornea und Glaskörper des Auges gefunden (23, 24). Typ III Kollagen besteht aus drei identischen α1(III) Ketten und stellt einen Anteil von 5 % bis 50 % des Kollagens in Haut, Leber, Lunge, Muskelgewebe und großen Arterien (25).

Typ	Kettenzusammensetzung	Gewebsverteilung
I	$(\alpha 1(I))_2 \alpha 2(I)$	Haut, Knochen, Sehnen Muskelfaszien, Dentin
II	$(\alpha 1(II))_3$	Knorpel, Kornea, Glaskörper des Auges, Nucleus pulposus der Bandscheiben
III	$(\alpha 1(III))_3$	Arterien, Muskelgewebe, Lunge, Leber, Haut
IV	$(\alpha 1(IV))_2 \alpha 2(IV)$	Basalmembranstrukturen Niere, Placenta, Linsenkapsel
V	$(\alpha 1(V))_2 \alpha 2(V)$	glatte Muskulatur, Placenta, Basalmembranen
VI	- ? -	" Intimakollagen ", Placenta

Tabelle 1: Die wichtigsten strukturell und genetisch verschiedenen Kollagentypen (nach 28, 120)

Typ IV Kollagen kommt in erster Linie in Basalmembranen, den Strukturen zwischen Epithel und Bindegewebe, vor und bildet im Unterschied zu den interstitiellen Kollagenen keine Fibrillenstruktur sondern ein komplexes Netzwerk (26). Je vier Tripelhelices sind über eine Vernetzungsdomäne (7S Kollagen) miteinander verbunden (27). Typ V Kollagen kommt in glatter Muskulatur und in Placenta vor und besteht wie Typ I Kollagen aus verschiedenen Polypeptidketten (29). Typ VI Kollagen ("Intimakollagen") wurde aus Placentagewebe gewonnen (30). Das monomere Molekül besitzt globuläre Enden und einen zentralen helikalen Bereich und kann sich über Dimere und Tetramere zu filamentösen Strukturen organisieren (31). Weitere Kollagenketten wurden in Knorpelmaterial gefunden (siehe 1.2.1.).

In mehreren Proteinen wurden tripelhelikale kollagenähnliche Domänen entdeckt. Das Protein Clq des Komplementsystems (32) und die Acetylcholinesterase (33) besitzen solche Domänen.

1.1.4. Genomstruktur des Kollagens

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden gelang es in den letzten Jahren, DNA von Eukaryonten näher zu charakterisieren. Dabei stellte sich als Hauptunterschied zu Prokaryonten- DNA heraus, daß in Eukaryonten- DNA die proteinkodierenden Sequenzen (Exons) innerhalb eines Gens durch nichtkodierende Bereiche der DNA (Introns) unterbrochen sind (34).

Als erste Kollagen kodierende genomische DNA wurde die DNA der α2(I) Kette vom Huhn genauer charakterisiert. Sie ist etwa 38000 Basenpaare lang und hat mindestens 50 Introns. Die meisten der Exons, die den tripelhelikalen Teil des Moleküls kodieren, sind 54 oder 2 x 54= 108 Basenpaare lang, was zu der Hypothese geführt hat, daß die heutigen interstitiellen Kollagene durch Genduplikation aus einem Urkollagen mit 18 Aminosäuren entstanden sind (35, 36). Zwei neuere Untersuchungen an einem genomischen Klon für α1(I) Kollagen (37) aus einer Cosmid- Genbank menschlicher DNA und einem genomischen α1(I) Klon aus einer Genbank von Maus- DNA (38) erbrachten ebenfalls Hinweise auf 54 bp Exons und stützten damit diese Hypothese über die Entwicklung kollagener Proteine. Daß die Frage nach der Herkunft kollagener Proteine komplexer ist als ursprünglich angenommen, zeigte die Untersuchung der Kollagengene in Nematoden (39) und Drosophila (40). In diesen Genen fand man nicht die typischen 54 bp Exons.

1.2. Der Chondrocyt, ein System zum Studium der Genexpression von Eukaryonten

1.2.1. Der Chondrocyt in seiner physiologischen Funktion.

Das histologische Bild von Knorpel zeigt Gruppen von knorpelbildenden Zellen (Chondrocyten), die in die Knorpelmatrix eingebettet sind (41). Diese besteht hauptsächlich aus Typ II Kollagen und Chondroitinsulfat - Proteo-

glycanen (42,43). Einige Kollagenketten wurden in den letzten Jahren entdeckt, die einen geringen Teil, weniger als 10% (44), des Knorpelkollagens ausmachen: In Knorpelgewebe von Mensch und Rind wurden die Kollagenketten 1α , 2α , und 3α gefunden (45). Die Ketten 1α und 2α ähneln in der Aminosäurezusammensetzung und dem Muster der Spaltung mit Bromcyan und Staphylococcus V8 Protease den α-Ketten von Typ V Kollagen (44). Die Kette 3α ähnelt sehr der α1(II) Kette. In Hühnersterna wurden zwei weitere kollagene Komponenten gefunden, HMW- (high molecular weight) und LMW (low molecular weight) Kollagen (44, 46). Diese sind wie die 1α und 2α Ketten ebenfalls mit Typ V Kollagen verwandt.

1.2.2. Die Umschaltung der Chondrocyten in Zellkultur

Im Verlauf von etwa zwei bis vier Wochen Zellkultur verändern die Chondrocyten ihre Form von polygonal nach gestreckt- fibroblastenähnlich (47). Die Veränderung der Morphologie wird von einer Veränderung der Genexpression begleitet. Dies wurde zuerst für die Kollagensynthese gezeigt. Die Zellen schalten von der Synthese von Typ II Kollagen als Hauptprodukt auf Typ I Kollagen als Hauptprodukt um (48). Diese Umschaltung ist weitgehend mit der morphologischen Veränderung der Zellen korreliert (49). Dies gilt jedoch nicht unbedingt auf der Ebene jeder einzelnen Zelle, wie eine Immunfluoreszenzstudie zeigte (50). Außer Typ I Kollagen bilden umgeschaltete Chondrocyten Trimere der α1(I) Kollagenkette (22) sowie Typ III

Kollagen (51, 52). In Morphologie und Kollagensynthese nähern sich die Chondrocyten also einem fibroblastenähnlichen Zustand an.

Auch das Proteoglycansynthesemuster ändert sich bei der Umschaltung der Chondrocyten. Die Kettenlänge der Glycosaminoglycane nimmt ab (53). Parallel zum Alterungsprozeß von Versuchstieren findet man bei Gewebekultur von Knorpelstückchen ein Umschalten von Chondroitinsulfat auf Keratansulfat (54). Die Stimulierbarkeit von Enzymsynthese durch Hormoneinwirkung verändert sich: Die Ornithindecarboxylase (ODC) wird in frisch isolierten Zellen durch Parathormon induziert, in umgeschalteten Zellen nicht mehr (55). Die ODC katalysiert die Bildung von Putrescin aus Ornithin. Putrescin und andere Polykationen spielen eine wichtige, aber noch nicht näher geklärte Rolle bei der Proliferation von Zellen.

Insgesamt beobachtet man eine grundsätzliche Umstrukturierung der Zellen, bei der eine Reihe von Veränderungen gleichzeitig ablaufen. Zum Teil entsprechen die Veränderungen einer Rückkehr aus dem differenzierten Chondrocytenzustand zum Zustand einer undifferenzierten mesenchymalen Zelle der Extremitätenanlage. Deswegen nennen einige Autoren die Umschaltung der Chondrocyten Dedifferenzierung (56).

1.2.3. Die Beeinflussung der Umschaltgeschwindigkeit der Chondrocyten in Zellkultur

Es gibt mehrere Agenzien völlig verschiedenen Charakters, die die Umschaltung von Chondrocyten in Zellkultur beschleunigen. Schon bald nach der Entdeckung des Umschaltvorgangs fand man die beschleunigende Wirkung von Hühnerembryoextrakt bei Hühnerchondrocyten (57). Eine sehr stark wirkende Substanz ist 5- Bromo - 3' - deoxyuridin (BrdUrd), das die Zellen innerhalb von einer Woche völlig umschaltet (58). Ein anderes Agens ist Fibronektin (59). Konditionierte Kulturmedien zum Beispiel von Hühnerkalvarien (51) beschleunigen ebenfalls die Umschaltung stark. Das aktive Prinzip der konditionierten Medien ist bisher noch nicht näher charakterisiert. Substanzen, die die Umschaltung verhindern, hat man bisher noch nicht gefunden. Allerdings stabilisieren generell Bedingungen , die sich dem Zustand der Chondrocyten in der Matrix annähern (zum Beispiel dichte Kultur der Zellen, Suspensionskultur) den differenzierten Zustand (60). Weiterhin ist darauf hinzuweisen, daß für die Umschaltung keine Zellteilung notwendig zu sein scheint (61)

1.2.4. Medizinische Bedeutung des Umschaltvorgangs der Chondrocyten.

Die Funktion von Gelenken ist abhängig vom intakten

Zustand des Gelenkkorpels, der Elastizität und Gleitfähigkeit besitzen muß. Verschiedene Krankheiten rheumatischen und nichtrheumatischen Ursprungs beeinträchtigen den Zustand des Knorpels (62). Besonders tiefgreifende Schäden des Knorpels findet man bei der Osteoarthrose. Im histologischen Bild sieht man eine Degeneration der Knorpelstruktur. Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen die unphysiologische Ablagerung von Typ I Kollagen im erkrankten Gewebe (63). Die Labilität der Genexpression, die man im artifiziellen System der Zellkultur von Chondrocyten findet, zeigt sich also auch im pathologischen Zustand des Knorpels bei der Osteoarthrose. Was die Ursache dieser Labilität ist und wie sie sich auf der Ebene von RNA und DNA äußert, wird dadurch zu einer Frage von medizinischer Bedeutung.

1.3. Genregulation bei Eukaryonten

Studium der Kollagensynthese mit molekularbiologischen Methoden

Die Methoden der modernen Molekularbiologie ermöglichen es seit etwa einem halben Jahrzehnt, die Genexpression auch von höheren Lebewesen zu studieren. Das am besten untersuchte System ist wahrscheinlich das System der Globingene (64). Hier war es möglich, bei einigen Formen der Thalassämie, einer erblichen Störung der Synthese von Globinketten (65), genau die molekularen Defekte aufzuklären (zB. 66). Auf dem Gebiet der Expression der Kollagengene konnte man sowohl für Transkriptionskontrolle

als auch für Translationskontrolle Beispiele finden. Diese sollen kurz geschildert werden zusammen mit ersten Ergebnissen, die beim Chondrocytensystem gefunden wurden.

1.3.1. Transkriptionskontrolle der Kollagensynthese

Als Modellsysteme für Transkriptionskontrolle dienten bisher in erster Linie viral transformierte Bindegewebszellen. Schon 1966 war entdeckt worden, daß die Transformation von 3T3 Zellen (einer etablierten Zellinie) mit SV 40 Virus die Syntheserate von Kollagen signifikant verminderte (67). Auch bei frisch isolierten Fibroblasten konnte die Kollagensynthese durch Transformation mit Rous Sarcoma Virus vermindert werden, in diesem System auf ein Zehntel der Kontrollwerte innerhalb von drei Tagen nach Infektion (68).

Diese Studien auf der Ebene des Proteins wurden in neuerer Zeit durch Studien auf der Ebene der mRNA ergänzt. Embryonale Fibroblasten wurden mit Rous Sarcoma Virus transformiert. Mit der Methode der zellfreien Translation konnte gezeigt werden, daß die transformierten Zellen weniger funktionelle Kollagen - mRNA bilden als die untransformierten (Kontroll-) Zellen (69). Durch verschiedene Methoden, die mRNA- Konzentrationen unabhängig vom funktionellen Zustand der mRNAs zu bestimmen (70 - 72), wurde bestätigt, daß transformierte Fibroblasten weniger Prokollagen mRNA bilden. Daraus wurde der Schluß gezogen (71), daß die Kollagensynthese in transformierten Fibroblasten infolge einer Veränderung der Transkriptionskontrolle vermindert ist. Eine neuere Untersuchung an trans-

formierten Rattenzellen (73) zeigte, daß die Kollagensynthese umso stärker vermindert wird, je stärker transformierend das Agens ist, das auf die Fibroblasten einwirkt. Beim Absinken der Kollagen mRNA Synthese verursacht durch Transformation scheint die Methylierung der genomischen DNA keine größere Rolle zu spielen (74). Dieser Befund ist jedoch noch umstritten (75).

1.3.2. Translationskontrolle der Kollagensynthese

Auf verschiedenen Wegen wurde versucht, Indizien für eine posttranskriptionale Kontrolle der Kollagensynthese zu finden (76). Am fruchtbarsten erwies sich die Untersuchung der Erbkrankheit Dermatosparaxis, einer Krankheit, die bei Schafen und Rindern vorkommt. Zuerst wurde bei befallenen Tieren eine erhöhte Konzentration von Prokollagen in der Haut gefunden (77), gekoppelt mit einer erniedrigten Konzentration von Aminopropeptid (78). Dies führte zur Konzeption einer feed- back Kontrolle der Kollagensynthese. Der inhibierende Effekt des Aminopropeptids von Typ I Kollagen (α1- Kette) wurde im Zellkultursystem an Fibroblasten nachgewiesen (79, 80), und zwar für die Synthese von Typ I und Typ III Kollagen. Beim Menschen kommt eine Erbkrankheit vor (Ehlers Danlos Typ VII), die gewisse Ähnlichkeit mit der Dermatosparaxis aufweist (81).

In letzter Zeit wurde der direkte Effekt von Prokollagenpeptiden auf die zellfreie Translation von Prokollagen mRNA getestet (82, 83). Diese Untersuchungen zeigten eine spezifische Inhibition der Prokollagensynthese

ohne Beeinflussung der zellfreien Translation nichtkollagener Proteine und stützten damit die Konzeption einer feed - back Kontrolle der Kollagensynthese auf Translationsebene.

1.3.3. Untersuchungen am Chondrocytensystem auf der Ebene der Nukleinsäuren

Bei der Untersuchung der Genexpression ist die Ebene der mRNA leichter zugänglich als die Ebene der DNA. So gelang es vor kurzer Zeit , parallel zu dieser Arbeit, mRNA aus Chondrocyten zu isolieren und im zellfreien Translationssystem in Protein zu translatieren. Die Chondrocyten wurden außerdem durch Behandlung mit BrdUrd zur beschleunigten Umschaltung gezwungen und mRNA wurde aus den Zellen im umgeschalteten Zustand isoliert. Es zeigte sich, daß der Umschaltung von Typ II auf Typ I Kollagen entsprechend eine Umschaltung von translatierbarer mRNA von Typ II auf Typ I stattzufinden scheint (84).

Parallel zur eben zitierten Arbeit wurde die vorliegende Doktorarbeit begonnen. Ein Teil der Experimente befaßt sich mit der beschleunigten Umschaltung der Zellen verursacht durch BrdUrd bzw. Kalvarien- konditioniertes Medium. Der Hauptteil der Arbeit untersucht die spontane Umschaltung der Chondrocyten. Das System der spontan umschaltenden Chondrocyten wurde bevorzugt, weil es dem physiologischen Zustand näher zu sein schien.

Die Methode der zellfreien Translation erlaubt nur Aussagen über mRNA im funktionsfähigen Zustand. Sie wird in dieser Arbeit ergänzt durch die Methode der mRNA - cDNA Hybridisierung mit spezifischer Prokollagen cDNA unter Northern Bedingungen. Diese Methode erfaßt auch mRNA , die in einem nichttranslatierbaren Zustand vorliegt (85). Von den spezifischen cDNA Proben, die zur Northern Hybridisierung benötigt wurden, standen zwei für die beiden - Ketten von Typ I Kollagen (86, 87) gut charakterisiert zur Verfügung. Eine weitere cDNA - Probe (p550), die aus einer Sterna mRNA Präparation gewonnen wurde, wurde im Verlauf dieser Arbeit charakterisiert und ebenfalls für Hybridisierungsstudien eingesetzt.

2. Aufgabenstellung

Chondrocyten (Knorpelzellen), die etwa sechs Wochen in Monolayer- Zellkultur gehalten werden, verändern ihr Aussehen von einer polygonalen, für Chondrocyten typischen Morphologie zu einer gestreckt- fibroblastoiden Morphologie. Gleichzeitig ändert sich die Genexpression der Zellen, und sie schalten ihre Kollagensynthese von Typ II Kollagen auf Typ I Kollagen um. Dieser Umschaltprozeß sollte untersucht werden, insbesondere mit molekularbiologischen Methoden.

1. Charakterisierung des Versuchssystems:

Die Umschaltung der Chondrocyten sollte mit morphologischen Methoden verfolgt werden. Die Veränderungen bei der Kollagenbiosynthese sollten gemessen werden. Ein die Umschaltung beschleunigender Faktor in konditionierten Medien von Kalvarien sollte untersucht werden.

2. Untersuchung der Umschaltung der Kollagensynthese auf mRNA Ebene:

mRNA aus umschaltenden Chondrocyten sollte von verschiedenen Zuständen der Zellen isoliert werden. Die Prokollagen mRNA sollte durch zellfreie Translation und unabhängig davon durch Northern Hybridisierung zu spezifischen cDNA- Klonen untersucht werden.

3. Charakterisierung des cDNA Klons p550:

Ein neuer cDNA Klon (p550), der aus Sterna mRNA

gewonnen worden war, sollte charakterisiert und sequenziert werden. Die Leserichtung der cDNA sollte bestimmt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Biochemische und zellbiologische Untersuchungen am Chondrocytensystem

3.1.1. Umschaltung der Chondrocyten- morphologische Untersuchung

Chondrocyten aus embryonalem Knorpel von Hühnern ändern in einer Monolayer- Zellkultur ihre Form von polygonal nach gestreckt- fibroblastoid. Außerdem schalten sie von der Synthese von Typ II Kollagen auf die Synthese von Typ I Kollagen und anderen Kollagentypen um. Diese Dedifferenzierung der Zellen läuft in einer Monolayerkultur reproduzierbar ab. Durch die Reproduzierbarkeit dieses Vorgangs und dadurch, daß in der Kollagensynthese eine gut charakterisierte Veränderung auftritt, werden die Chondrocyten zu einem hervorragend geeigneten Modellsystem zum Studium der Expression der Kollagengene in vitro.

Um den Umschaltvorgang der Zellform von polygonal nach gestreckt genauer erfassen zu können, wurden Monolayerkulturen von Chondrocyten sieben Wochen lang beobachtet. Nach zwei und nach vier Wochen wurden die Zellen trypsiniert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde im Mikroskop das Verhältnis von fibroblastoid- gestreckten zu polygonalen Zellen ausgezählt. Abbildung 3 zeigt die Zellen nach verschiedener Kulturdauer, Abb. 3A zeigt die Zellen einen Tag nach dem Plattieren, Abb. 3B zwei Tage später und

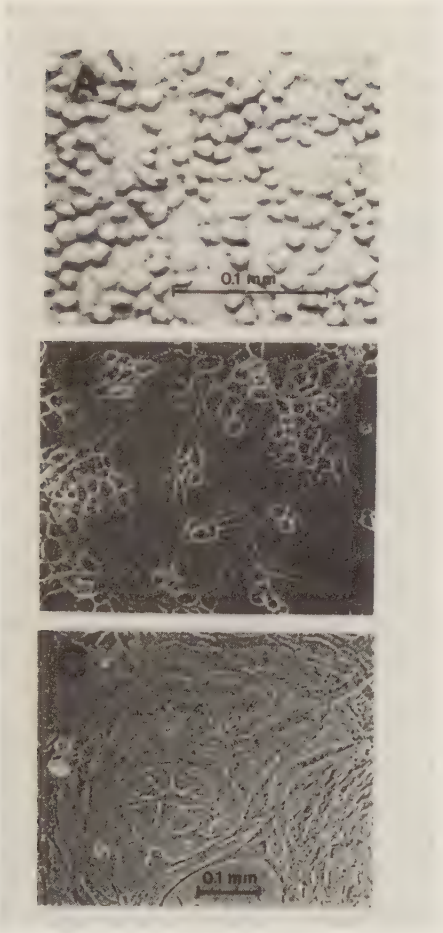


Abb. 3: Lichtmikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast) von embryonalen Hühnerchondrocyten in Zellkultur

A: am Tag nach der Isolierung, Vergrößerung 240x

B: nach zwei Tagen Kulturdauer, Vergrößerung 120x

C: nach vier Wochen Kulturdauer, Vergrößerung 120x

Abb. 3C vier Wochen nach dem Plattieren. Der prozentuale Anteil von gestreckten (umgeschalteten) Zellen ist in Abb. 4 dargestellt. Die Kurve zeigt, daß die Zellen im Zeitraum von sieben Wochen einen Zustand erreichten, der im Rahmen der Meßgenauigkeit dem Zustand der Fibroblasten (90% gestreckte Zellen) entsprach.

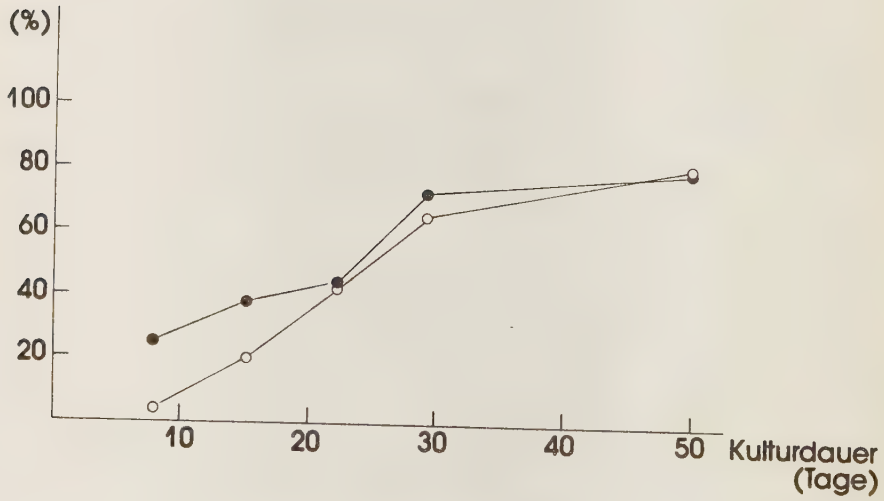


Abb.4: Vergleich der Umschaltung der Kollagensynthese von Typ II auf Typ I Kollagen in dedifferenzierenden Chondrocyten mit der Veränderung ihrer Morphologie

●—● % Typ I Kollagen, bestimmt durch CM- Cellulosechromatographie

○—○ % fibroblastoide Zellen (spindelförmig gestreckt)

3.1.2. Bestimmung des Anteils von Typ I Kollagen an der Kollagensynthese von umschaltenden Chondrocyten

Die Zählung des Anteils von gestreckten Zellen als Maß für die fortschreitende Umschaltung von Chondrocyten stellt eine einfache Methode zur Verfolgung der Dedifferenzierung dar. In einer weiteren Untersuchung wurde überprüft, ob diese morphologische Umschaltung und die Umschaltung von Typ II auf Typ I Kollagen parallel verlaufen. Die Monolayerkulturen des vorhergehenden Versuchs wurden an verschiedenen Tagen mit (^{3}H)- Prolin markiert. Aus den Syntheseprodukten der Zellen wurde Kollagen isoliert und die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Ketten wurden unter denaturierenden Bedingungen durch CM-Cellulosechromatographie getrennt. Aus dem $\alpha 1/\alpha 2$ Verhältnis wurde der Anteil von Typ I Kollagen an der Gesamtkollagensynthese berechnet (siehe Methodenteil). Das Ergebnis dieser parallelen Untersuchung ist ebenfalls in Abb. 4 dargestellt.

Es zeigte sich, daß der Umschaltprozeß von Typ II auf Typ I Kollagen und die morphologische Veränderung der Zellen parallel verliefen. Die durch einfaches Auszählen bestimmbare Fraktion von fibroblastoiden Zellen war also ein gutes Maß für die fortschreitende Umschaltung. In dieser Weise war es möglich, den Zustand des Versuchssystems in jedem Stadium unmittelbar zu erkennen. Das System sollte jedoch nicht nur leicht überprüfbar sondern auch manipulierbar sein. Bisher war es gelungen, eine Beschleunigung der Umschaltung durch verschiedene Agenzien zu erreichen.

3.1.3. Charakterisierung eines Faktors aus konditioniertem Medium von embryonalen Hühnerkalvarien, der die Dedifferenzierung von Chondrocyten beschleunigt.

Die Dedifferenzierung von Chondrocyten in Monolayer-Zellkultur wird durch Agenzien verschiedensten Charakters beschleunigt. Als besonders wirksam erwies sich in Untersuchungen, die an diesem Institut durchgeführt wurden (51), von embryonalen Hühnerkalvarien konditioniertes Medium. Die Natur des aktiven Prinzips im konditionierten Medium ist noch nicht aufgeklärt. Es sollte nun in Vorversuchen Information über das aktive Prinzip gewonnen werden.

Zunächst sollte eine Orientierung über die Molekülgröße des aktiven Prinzips erfolgen. Dazu wurde konditioniertes Medium von Kalvarien wie im Methodenteil beschrieben (5.2.1.5.) gewonnen. Vorversuche hatten gezeigt, daß das aktive Prinzip bei der Dialyse gegen PBS nicht verlorengeht, also nicht zu den kleinmolekularen Bestandteilen des konditionierten Mediums gehört. Deswegen wurde das konditionierte Medium für die folgenden Versuche gegen PBS dialysiert.

Durch Ultrafiltrationsschritte wurden nun drei Fraktionen gewonnen: Durch Sterilfiltration (Porengröße 0.22 µm) wurde eine Fraktion gewonnen, die nur von partikulären Bestandteilen befreit war. Durch Ultrafiltration mit

Amicon XA 100 und XA 50 Filtern wurden zwei Fraktionen mit einem Molekulargewicht kleiner als 100000 Dalton bzw. kleiner als 50000 Dalton gewonnen. Ein nicht filtriertes Aliquot des konditionierten Mediums diente als Kontrolle und wurde vor dem Kontakt mit den Chondrocyten UV- sterilisiert.

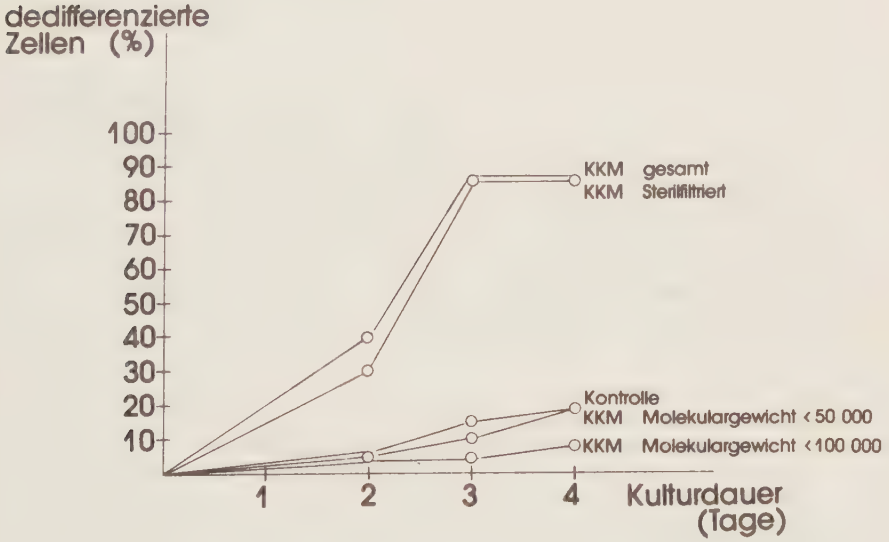


Abb.5: Wirkung von verschieden vorbehandeltem Kalvarien-konditioniertem Medium (KKM) auf die Dedifferenzierung von Chondrocyten in Monolayerkultur. Das Fortschreiten der Dedifferenzierung wurde durch Auszählen der fibroblastoid gewordenen Zellen verfolgt.

Aus Tag 17 Hühnerembryonen wurden wie beschrieben Chondrocyten isoliert und in einer Zelldichte von 8×10^3

Zellen pro cm^2 ausgesät. Die Zellen wurden mit Kulturmedien behandelt, die 80% Ham's F10 Medium mit Zusätzen und 20% Dialysat von konditionertem Kalvarienmedium nach verschiedener Vorbehandlung enthielten. Die Kulturmedien wurden nach zwei Tagen gewechselt. Die fortschreitende Umschaltung der Zellen wurde durch Auszählen der Fraktion von fibroblastoiden Zellen verfolgt. Abb.5 zeigt die Wirkung von den Kulturmedien mit verschieden vorbehandelten Fraktionen des Dialysats.

Abb.5 zeigt, daß bei Dialyse und Sterilfiltration des konditionierten Mediums die Aktivität, die die Chondrocytenumschaltung beschleunigt, nicht verloren geht. Fraktioniert man das konditionierte Medium durch Ultrafiltration, so zeigt sich, daß der aktive Faktor in den Fraktionen mit einem Molekulargewicht kleiner als 100000 nicht enthalten ist.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob der aktive Faktor hitzelabil ist. Erwärmung des Dialysats des konditionierten Mediums auf 70°C (90°C) für dreißig Minuten inaktivierte den Faktor, so daß die Umschaltung der Chondrocyten nicht beschleunigt wurde.

Die bisherigen Experimente zeigten, daß es sich bei der Aktivität in Kalvarien- konditioniertem Medium um einen hitzelabilen Faktor mit einem Molekulargewicht größer als 100000 Dalton handeln sollte, wahrscheinlich um ein Protein.

Eine weitere Untersuchung wurde unternommen, um

möglichst direkt Aussagen über das aktive Prinzip des konditionierten Mediums zu erhalten. Der Grundgedanke der Experimente war, daß der aktive Faktor an Chondrocyten binden oder von ihnen aufgenommen werden muß, um zu wirken. So sollten also nur diejenigen Bestandteile des konditionierten Mediums untersucht werden, die mit Chondrocyten in Wechselwirkung traten.

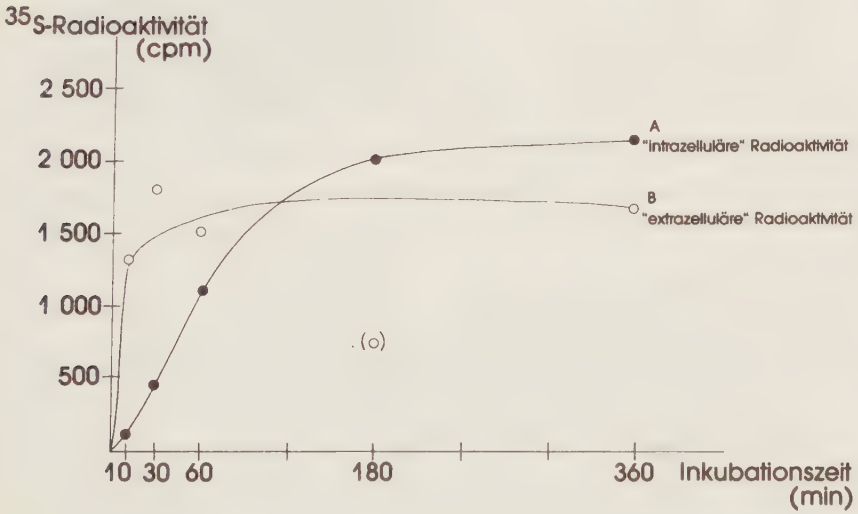


Abb. 6: Anlagerung und Aufnahme von ^{35}S- Methionin- markierten Proteinen durch frisch isolierte Chondrocyten in Monolayerkultur.

Die Syntheseprodukte von Kalvarien wurden mit ^{35}S-Methionin markiert. Das so gewonnene konditionierte Medium wurde steril gegen Ham's F10 Medium dialysiert. Es ergab

sich ein markiertes Medium mit einer Radioaktivität von 5 x 10^4 cpm/ml. Chondrocyten wurden frisch isoliert und in 6 cm Petrischalen in einer Dichte von 2 x 10^5 Zellen / cm^2 ausgesät. Die Zellen wurden verschiedene Zeiten (10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h) mit je 3 ml = 1.5 x 10^5 cpm des markierten Mediums inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Der gewaschene Zellrasen enthielt intrazelluläre und extrazelluläre Radioaktivität. Ein Teil der Petrischalen wurde mit Trypsin behandelt, um extrazelluläre Radioaktivität durch Verdauung freizusetzen. Nach der Trypsinbehandlung wurde nochmals gewaschen. Auf diese Weise wurde eine Fraktion von Zellrasen mit nur intrazellulärer Radioaktivität gewonnen. Abb. 6 zeigt die Aufnahme von Radioaktivität durch die Zellen, die Kurve "A" repräsentiert "intrazelluläre", die Kurve "B" freisetzbare, "extrazelluläre" Radioaktivität.

Die Kurven zeigen, daß die Zellen schnell, etwa innerhalb von 30 Minuten, markierte Bestandteile des konditionierten Mediums anlagerten. Wesentlich langsamer, etwa im Verlauf von 3 Stunden, erfolgt eine intrazelluläre Sättigung.

Die Proben von den gewaschenen und homogenisierten Chondrocyten, die sechs Stunden mit ^{35}S- markiertem konditionierten Medium behandelt worden waren, wurden auf einem Laemmli Gradientengel (5 - 10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Fluorographie ist in Abb.7 gezeigt. Die Auftrennung des

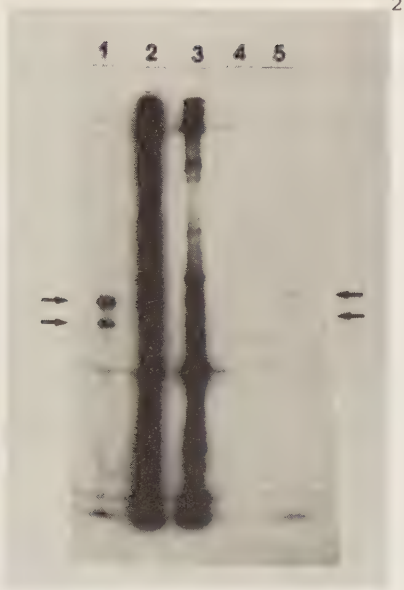


Abb. 7: Wechselwirkung von ^{35}S- Methionin- markierten Proteinen aus Kalvarien- konditionierten Medium mit frisch isolierten Chondrocyten

Bahn 1: Kollagen α1(I) und α2(I) Standard (Huhn)

Bahn 2: ^{35}S- markiertes Kalvarien- konditioniertes Medium

Bahn 3: dito, nach Sterilfiltration

Bahn 4: durch Chondrocyten internalisierte Proteine (Zellen trypsinbehandelt)

Bahn 5: an Chondrocyten adsorbierte und internalisierte Proteine (ohne Trypsinbehandlung)

Die Pfeile markieren die Kollagenbanden.

konditionierten Mediums (Bahn 3) zeigt 16 unterscheidbare Banden. Verschiedene Proteine wurden an die Zellen ver-

schieden stark adsorbiert und von ihnen internalisiert. Typ I Kollagen (α1 und α2 Ketten), das durch einen Standard von gereinigtem Kollagen identifiziert wurde (Bahn 1), wurde relativ stark gebunden (Bahn 5), aber nicht so gut internalisiert (Bahn 4). Eine Bande im hochmolekularen Bereich und eine Bande im Bereich von etwa 50 - 70 kD erschienen intrazellulär und extrazellulär bei den Chondrocyten. Beide Proteine wurden jedoch nicht wie die Kollagen α-Ketten selektiv an die Chondrocyten gebunden. In einem weiteren Experiment konnte ausgeschlossen werden, daß Kollagen Typ I die Umschaltung der Chondrocyten wesentlich beschleunigt. Ein Zusatz von 1 µM Kollagen führte zu keiner deutlichen Wirkung. 6 µM Kollagen in einem Nährmedium erhöhten die Viskosität des Nährmediums so stark, daß die Vitalität der Zellen beeinträchtigt wurde.

Kollagen war also nicht das aktive Prinzip des konditionierten Mediums, obwohl es das einzige Protein war, das auf dem Gel sichtbar, selektiv an Chondrocyten gebunden wurde. So lieferten die Experimente keinen Hinweis auf das Protein, das das aktive Prinzip war.

Eine Frage blieb noch zum Schluß, die die hochmolekulare Komponente betraf, die mit den Chondrocyten in Wechselwirkung trat. Da diese in der Elektrophorese ähnlich wie Fibronektin migrierte und da es bekannt war, daß Fibronektin die Dedifferenzierung der Chondrocyten beschleunigt (59), wurde das konditionierte Medium auf Fibronektin untersucht. Dr. W. Dessau führte dankenswerterweise einen Radioimmun-

assay durch, der negativ ausfiel. Bei der hochmolekularen Komponente des konditionierten Mediums handelte es sich also nicht um Fibronektin.

Der durchgeführte Versuch zeigte, daß der aktive Faktor des konditionierten Mediums kein in großer Menge vorkommendes Protein war, das spezifisch mit Chondrocyten in Wechselwirkung trat. An diesem Punkt der Arbeit wurde entschieden, sich auf die spontane Umschaltung der Chondrocyten in erster Linie und in zweiter Linie auf die durch BrdUrd beschleunigte Umschaltung zu konzentrieren, ohne den Faktor durch Anreicherungsversuche näher zu charakterisieren.

3.2. Untersuchung der Kollagen mRNA im Verlauf der Dedifferenzierung von Chondrocyten- Experimente der zellfreien Translation

Das folgende Kapitel enthält den ersten Teil der Hauptaufgabe dieser Arbeit, die Untersuchung der Umschaltung der Chondrocyten auf der Ebene der mRNA. Die mRNA sollte zunächst mit der indirekten Methode der zellfreien Translation bestimmt werden. Die Ergebnisse sollten mit den Ergebnissen der Biosynthese aus dem ersten Kapitel verglichen werden.

3.2.1. RNA- Präparation

Zunächst wurden aus Geweben von Tag 16 Hühnerembryonen RNA- Kontrollpräparate hergestellt, die zur Identifizierung

1. Extraktion von RNA aus Bindegewebe embryonaler Hühner

a) RNA aus Sterna:

Extraktion von 400 Sterna (Tag 16 Embryonen) mit Guanidiniumchlorid: Ausbeute 5 - 6 mg

Oligo dT Cellulosechromatographie der extrahierten RNA: Ausbeute 500 - 600 µg

Sucrosegradientenzentrifugation zur Anreicherung der Prokollagen mRNA: Ausbeute 120 - 150 µg

b) RNA aus Kalvarien:

Extraktion von 150 Kalvarien mit Guanidiniumchlorid: Ausbeute 5 - 6 mg

2. Extraktion von RNA aus Chondrocyten:

Extraktion mit Guanidiniumchlorid aus Chondrocyten nach verschiedener Kulturdauer: Ausbeute 2 - 8 µg pro 10^6 Zellen

Tabelle 2: Ausbeuten der RNA Extraktion aus Geweben und Zellen embryonaler Hühner (Tag 16)

der Translationsprodukte von Typ I und Typ II Prokollagen mRNA dienen sollten. Tag 16 Kalvarien (Schädelknochen) und Sterna (Brustbeine) wurden mit Guanidiniumchlorid extrahiert (siehe Tabelle 2). Die erhaltene RNA von Kalvarien ließ sich im Retikulocytenlysatsystem unter anderem in Typ I ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) Prokollagen translatieren.

Die Sterna RNA lieferte jedoch im Rohzustand kein Typ II Prokollagen als Translationsprodukt. Deshalb wurde zunächst durch eine oligo dT- Cellulosechromatographie ein großer Teil der ribosomalen RNA entfernt. Die angereicherte mRNA (oligo A^+) wurde durch Sucrosegradientenzentrifugation nach Größe getrennt. Dabei wurden alle Fraktionen gesammelt, die im Bereich der 28S rRNA und schneller sedimentierten. Dies war der Bereich, in dem auch Prokollagen Typ II mRNA sedimentierte (unpublizierte Daten Dr. P. Müller). Diese angereicherte Präparation konnte im Retikulocytenlysatsystem in Typ II Prokollagen translatiert werden. Allgemein translatierte Typ I Prokollagen mRNA immer besser als Typ II Prokollagen mRNA. Etwa 0.5 µg von Kalvarien RNA ergaben die gleiche Stärke der Kollagenbande α1 wie 0.2 µg hochgereinigter Sterna mRNA.

Für das Hauptexperiment mußten nun RNA- Präparationen aus Chondrocyten in verschiedenen Stadien der Dedifferenzierung gewonnen werden. Unter den gleichen Bedingungen wie bei der Untersuchung der Kollagen- Biosynthese wurden Hühnerchondrocyten sechs Wochen lang in Monolayerkultur gehalten. Nach zwei und nach vier Wochen wurden die Zellen trypsiniert und dabei wurden jeweils die Zellen einer Petrischale auf vier Petrischalen verteilt. Am Ende der sechs Wochen waren die Zellen vollständig fibroblastoid geworden. An den Tagen 1, 2, 3, 7, 14, 28 und 42 wurde aus den Zellkulturen nach der Guanidiniumchloridmethode RNA extrahiert (siehe Tabelle 2).

3.2.2. Vorversuche für die zellfreie Translation

Schon die ersten orientierenden Versuche hatten gezeigt, daß Typ II Prokollagen mRNA nicht so gut translatiert wie Typ I Prokollagen mRNA. Deswegen war es wünschenswert, die Bedingungen der zellfreien Translation auf eine optimale Translation von Typ II Prokollagen mRNA hin zu optimieren. Erfahrungen einer amerikanischen Arbeitsgruppe (88) hatten gezeigt, daß sich für die zellfreie Translation von Prokollagen mRNA am besten das Retikulocytenlysatsystem eignet. In dieser Arbeit wurde dehalb nur dieses System verwendet. Die synthetisierten Proteine wurden bei allen Versuchen mit ^{35}S- Methionin markiert. Da es in der Literatur Hinweise darauf gab, daß Methylquecksilberhydroxid die zellfreie Translation großer Proteinmoleküle durch Einwirkung auf die RNA- Sekundärstruktur verbessert (89), wurde der Effekt von Methylquecksilberhydroxid auf die Translation von Typ II Prokollagen getestet. In fünf 25 µl Ansätzen wurde jeweils 0.2 µg von RNA aus frisch isolierten Chondrocyten zellfrei translatiert (Abb. 8). Die Ansätze enthielten 0, 0.4, 0.8, 1.2 und 1.6 mM (Endkonzentration) von Methylquecksilberhydroxid. Abb. 8 zeigt die Fluorographie von diesen fünf Proben und dazu als Standard die Translationsprodukte von Kalvarien RNA. Die Kollagenbanden, die später noch experimentell identifiziert wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Es zeigte sich, daß Methylquecksilberhydroxid in geringen Konzentrationen kaum Einfluß auf die zellfreie Translation von Typ II Prokollagen hatte. In höheren Konzentrationen hemmte es die Translation aller Proteine unspezi-

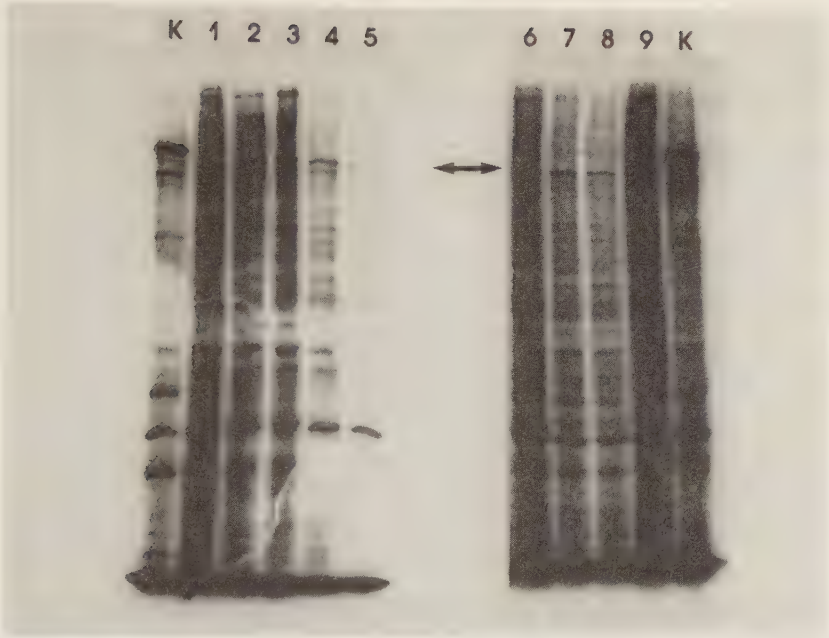


Abb. 8: Zellfreie Translation von RNA aus frisch isolierten Chondrocyten im Retikulocytenlysatsystem in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Methylquecksilberhydroxid.

Bahn 1: ohne MeHgOH, Bahn 2: 0.4 mM MeHgOH, Bahn 3: 0.8 mM MeHgOH, Bahn 4: 1.2 mM MeHgOH, Bahn 5: 1.6 mM MeHgOH, Bahn K: Zellfreie Translation von Kalvarien RNA als Standard

Abb. 9: Zellfreie Translation von RNA aus frisch isolierten Chondrocyten in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Kaliumchlorid.

Bahn 6: 12 mM KCl, Bahn 7: 18 mM KCl, Bahn 8: 24 mM KCl, Bahn 9: ohne KCl, Bahn K: siehe Abb. 8

Die Pfeile markieren die α1(II) Prokollagenbande

fisch. Da die Zugabe von Methylquecksilberhydroxid keine Verbesserung der zellfreien Translation von Typ II Prokollagen bewirkte, wurde es bei den folgenden Experimenten nicht mehr eingesetzt.

Abb. 9 zeigt den Einfluß von Kaliumchlorid auf die zellfreie Translation von Chondrocyten RNA (siehe auch 90). In einem ähnlichen Experiment wie dem oben beschriebenen wurde Chondrocyten RNA (0.2 µg) mit 0, 12, 18 und 24 mM KCl zellfrei translatiert. Bei Zugabe von Kaliumchlorid kam es zu einer Inhibition der Translation, hauptsächlich jedoch wurde der Untergrund von nicht kollagenspezifischer Translation gehemmt. Als optimale KCl-Konzentration mit dem günstigsten Verhältnis zwischen der Stärke der Kollagenbanden und dem Untergrund wurde eine Konzentration von 12 mM für die folgenden Experimente gewählt.

Als nächster Versuchsparameter sollte die Inkubationszeit der zellfreien Translation optimiert werden. Unter Zusatz von 12 mM Kaliumchlorid wurden je ein 90 µl Ansatz mit Sterna RNA (nach Sucrosegradientenzentrifugation) oder Kalvarien RNA (je 4µg) bei 30 ^{o}C inkubiert. Nach 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten wurde je ein Aliquot entnommen. Die Produkte der zellfreien Translation wurden wieder gelelektrophoretisch getrennt. Die Synthese von Typ I und Typ II Prokollagen nahm etwa eine Stunde lang linear zu. Nach eineinhalb Stunden konnte man noch eine weitere geringe Zunahme sehen und nach zwei Stunden nahm die Stärke der

Kollagenbanden wieder etwas ab (Ergebnisse nicht gezeigt). Da die maximale Stärke der Kollagenbanden etwa nach eineinhalb Stunden erreicht war, wurden ab diesem Experiment alle Proben der zellfreien Translation je 90 Minuten inkubiert.

3.2.3. Identifizierung der Kollagenbanden

In den ersten Versuchen der zellfreien Translation (3.2.2.) hatte sich gezeigt, daß die RNA aus frisch isolierten Chondrocyten die gleichen zellfreien Translationsprodukte lieferte wie die RNA aus Sterna nach der Reinigung durch odT- Cellulosechromatographie. In der Größe von Prokollagenketten wurde bei beiden RNA- Präparationen nur ein Protein translatiert, das im folgenden als die pro α1 Kette von Typ II Kollagen identifiziert werden soll.

Eine Möglichkeit der Erkennung von Kollagen-Proteinsequenzen ist die Verdauung mit bakterieller Kollagenase, die Gly-X-Y Sequenzen des tripelhelikalen Bereichs erkennt und spezifisch in kleine Peptide spaltet. Sterna RNA und Kalvarien RNA (je 0.5 µg) wurden in einem 25 µl-Ansatz zellfrei translatiert und nach der Translation wurde je die Hälfte der Proben bei 37 ^{o}C fünf Minuten lang mit bakterieller Kollagenase abgebaut.

Abbildung 10 zeigt die Gelelektrophorese der Produkte. Die kollagenasesensitiven Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. In beiden Fällen tauchte nach Kollagenasebe-

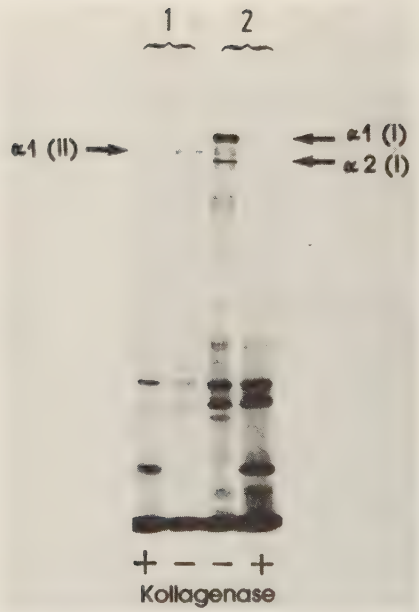


Abb. 10: Zellfreie Translation im Retikulocytenlysat von RNA aus Sterna (1) nach odT Cellulosechromatographie und Sucrosegradientenzentrifugation sowie Kalvarien (2) von Tag 16 Hühnerembryonen. Äußere Bahnen: Ein Aliquot der Proben der zellfreien Translation wurde mit hochgereinigter bakterieller Kollagenase abgebaut.

handlung eine neue starke Bande im niedermolekularen Bereich auf. Bei dieser handelte es sich vermutlich um das C-terminale Propeptid des Prokollagens. Das N-terminale Propeptid wurde nicht markiert, weil es kein Methionin enthält (91). Dieser Versuch bewies, daß die bezeichneten Banden von kollagenen Proteinen herrührten.

Um nachzuweisen, daß Kalvarien RNA Typ I Prokollagen und Sterna oder Chondrocyten RNA Typ II Prokollagen in der

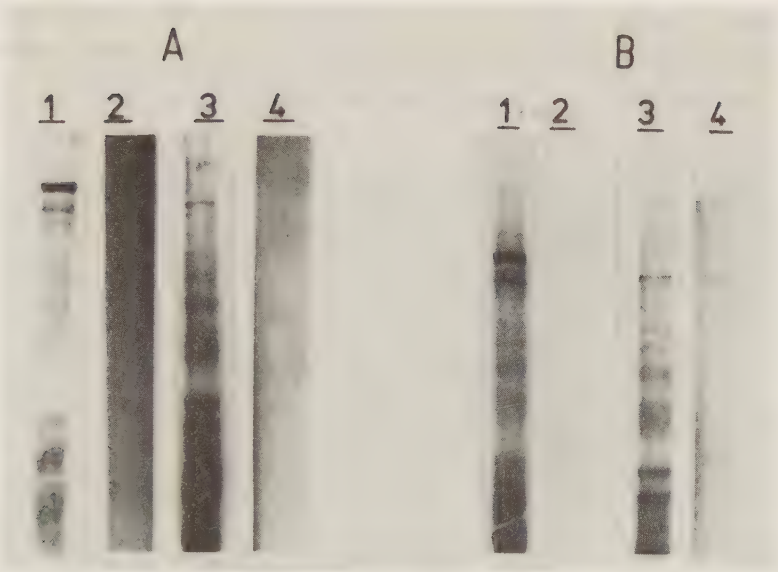


Abb. 11: Immunpräzipitation von Produkten der zellfreien Translation von RNA aus frisch isolierten Chondrocyten und Kalvarien

A: Präzipitation durch Antikörper gegen Typ I Prokollagen

B: Präzipitation durch Antikörper gegen Typ II Prokollagen

Bahn 1: Zellfreie Translation von Kalvarien RNA

Bahn 2: Immunpräzipitation zu Bahn 1

Bahn 3: Zellfreie Translation von RNA aus frisch isolierten Chondrocyten

Bahn 4: Immunpräzipitation zu Bahn 3

zellfreien Translation codierten, wurde eine Immunpräzipitation der Produkte der zellfreien Translation durchgeführt (Abb. 11). Die mRNA in Kalvarien RNA wurde in zwei

Kollagenketten übersetzt. Diese wurden durch Antikörper präzipitiert, die gegen Typ I Prokollagen gerichtet waren (Abb. 11A Bahn 2). Diese Banden entsprechen Prokollagen α1(I) und α2(I). mRNA aus Sterna lieferte bei der zellfreien Translation ein Protein, das durch Antikörper präzipitiert wurde, die gegen Typ II Kollagen gerichtet waren (Abb. 11 B, Bahn 4). Typ II Kollagenantikörper präzipitierten die Produkte von Kalvarien mRNA nicht, und Antikörper gegen Typ I Prokollagen reagierten nicht mit den Produkten der mRNA von frisch isolierten Chondrocyten. Durch diese Ergebnisse wurden die Prokollagen Typ I Ketten als Genprodukte der Kalvarien und die Prokollagen Typ II Ketten als Genprodukt von Sterna identifiziert . Die beiden Banden bei Prokollagen Typ I unterschieden sich in ihrer Intensität etwa im Verhältnis obere zu untere Bande wie 2 : 1, was die Zuordnung der oberen Bande als α1(I) und der unteren Bande als α2(I) Prokollagen möglich machte. Dabei war es noch von Bedeutung, daß in der Elektrophorese die α1(II) Bande schneller als die α1(I) aber langsamer als die α2(I) Bande wanderte, so daß alle drei Banden nebeneinander identifiziert werden konnten.

3.2.4. Die Umschaltung der Chondrocyten während längerer Kulturdauer - Verfolgung der mRNA Mengenverhältnisse durch zellfreie Translation.

Von den Chondrocyten, die bis zur völligen Umschaltung in Monolayerkultur gehalten worden waren, lagen von den

Tagen 1, 2, 3, 7, 14, 28 und 42 RNA-Präparationen vor. Diese RNA-Präparationen wurden im zellfreien System sehr gut translatiert, so daß auf weitere Reinigungsschritte

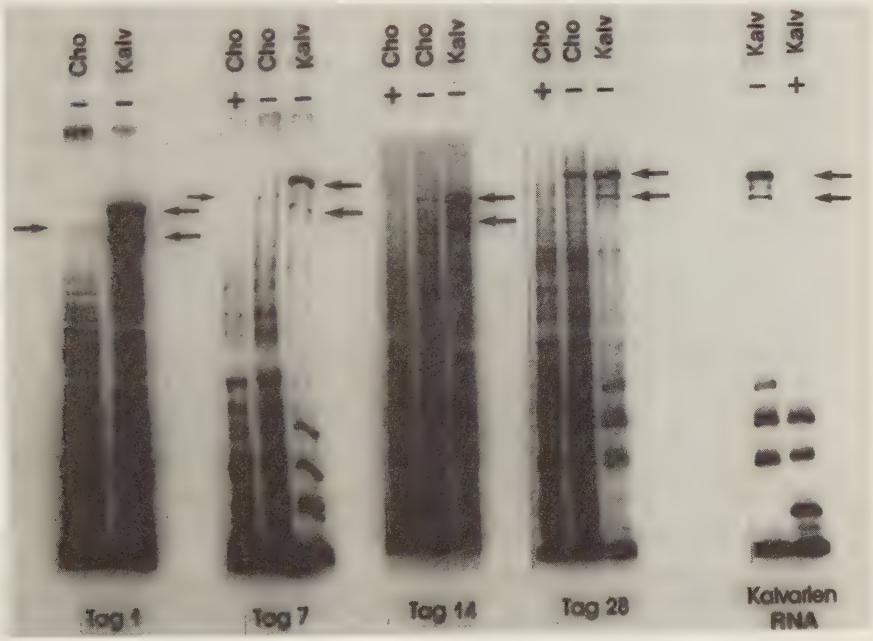


Abb. 12: Hauptexperiment: Zellfreie Translation im Retikulocytenlysatsystem von RNA- Proben aus Chondrocyten (Cho) verschiedener Kulturdauer (1, 7, 14, 28 Tage)
+: Proben mit hochgereinigter bakterieller Kollagenase verdaut
-: Proben ohne Kollagenasebehandlung. Die Prokollagenbanden sind durch Pfeile gekennzeichnet.
Kalv. : Zellfreie Translationsprodukte von Kalvarien als Standard.

verzichtet wurde. Abb. 12 zeigt ausgewählte Ergebnisse der zellfreien Translation für Chondrocyten an Tag 1, 7, 14 und 28. Bei einigen der Proben wurde nochmals eine Kollagenasebehandlung durchgeführt, um die Kollagenbanden zweifelsfrei zu identifizieren.

Folgendes Muster der Kollagensynthese ergab sich: Am Tag 1 trat nur mRNA auf, die für α1(II) Prokollagen codierte. Am Tag 7 trat zu dieser Bande die α1(I) Bande hinzu. Ab Tag 14 wurden dazu α2(I) Prokollagenketten gebildet, also sowohl Typ II als auch Typ I Prokollagen. Am Tag 28 konnte man nur noch die Synthese von Typ I Prokollagen (α1 und α2 Ketten) erkennen. Es wurde also zuerst Typ II Prokollagen translatiert, dann Typ II und Typ I gemeinsam, wobei zuerst die α1(I) Kette, dann auch die α2(I) Kette gebildet wurden. Ab der vierten Woche wurde dann nur noch Typ I Prokollagen translatiert.

3.2.5. Die Beschleunigung der Umschaltung durch das Agens 5-Bromodeoxyuridin (BrdUrd)

Wie eingangs beschrieben, ist 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdUrd) eines der Agenzien, das die Veränderung der Chondrocyten, sowohl der Gestalt als auch der Kollagensynthese beschleunigen können. In einer ergänzenden Untersuchung sollte geklärt werden, ob dieser Effekt sich ebenfalls auf der Ebene der mRNA auswirkt. So wurden Chondrocyten eine Woche lang in Monolayerkultur gehalten, wobei dem Kulturmedium 30 µM BrdUrd zugesetzt waren. Eine Kontroll-

Abb. 13: Zellfreie Translation im Retikulocytenlysatsystem von RNA aus Chondrocyten nach einer Woche Kulturdauer

1: Chondrocyten- RNA 0.4 µg 2: Chondrocyten- RNA 0.6 µg

3: Chondrocyten- RNA 1.0 µg 4: Kalvarien- RNA 1.0 µg

A: Proben mit Kollagenase behandelt

B: Proben ohne Kollagenasebehandlung

kultur wurde unbehandelt gelassen. Am Ende der Woche wurde aus beiden Kulturen RNA präpariert. Die RNA wurde in einem zellfreien Translationssystem in Protein translatiert. Die Proben aus den BrdUrd- behandelten Zellen , wie üblich elektrophoretisch aufgetrennt, sind in Abb. 13 dargestellt. Am meisten fällt auf, daß nach BrdUrd Behandlung die Zellen

nach einer Woche schon eine RNA liefern, die sowohl α1(I) als auch α2(I) Prokollagen codiert. Beide Banden sind deutlich zu sehen. Bei der Kontrollkultur zeigt die zellfreie Translation nur eine α1(I) Bande aber noch keine α2(I) Bande wie im Hauptexperiment unter 3.2.4. beschrieben.

3.3. Untersuchung der Kollagen mRNA im Verlauf der Dedifferenzierung von Chondrocyten - DNA - RNA (Northern) Hybridisierungsexperimente

3.3.1. Voruntersuchungen

Die Untersuchung von mRNA durch zellfreie Translation erlaubt nur Aussagen über die Menge an funktionell intakter mRNA. Spezifische Sequenzen, die inaktiv sind, entgehen der Untersuchung. Diese werden jedoch auch bei der Hybridisierung mit spezifischer cDNA erfaßt. Um das Auftreten der mRNA für die zwei Kollagenketten α1(I) und α2(I) messen zu können, wurden zwei spezifische cDNA Klone benötigt, für jede Kette einer. Diese Klone standen bei Beginn dieser Arbeit gut charakterisiert zur Verfügung. Einer davon, pCol3, der von Yamamoto et al (86) konstruiert worden war, war spezifisch für α1(I) Prokollagen. Dieser Klon besitzt ein Insert von 800 bp Länge und codiert Teile des C- Terminus sowie Teile der Tripelhelix der α1(I) Prokollagenkette. Ein weiterer, pCol1, wurde von Sobel et al (87) konstruiert und war spezifisch für α2(I) Prokollagen. Er besitzt ein Insert von etwa 200 bp Länge und codiert einen

Teil des Carboxypropeptids der α2(I) Prokollagenkette. Als dritter cDNA Klon wurde der im letzten Teil der Arbeit charakterisierte cDNA Klon p550 aus Sterna verwendet. Dieser Klon enthielt ein 550 bp Insert, das komplementär zu einem Teil einer RNA aus Sterna war.

Bei der cDNA - RNA Hybridisierung unter Northern Bedingungen mußte man die Spezifität der cDNA Klone nachweisen, insbesondere um Kreuzhybridisierung zwischen Sequenzen zu verhindern, die für Typ I und Typ II Prokollagen codieren. Abb. 14 zeigt eines der Experimente, mit denen Bedingungen für eine spezifische Hybridisierung etabliert wurden. pCol3 (α1(I)) cDNA wurde wie im Methodenteil beschrieben mit Kalvarien- und Sterna RNA hybridisiert. Bei 37 °C Hybridisierungstemperatur zeigte sich eine Kreuzhybridisierung von dieser cDNA mit Sterna RNA. Die entsprechende Bande ist sehr schwach (Abb. 14). Bei einer Hybridisierungstemperatur von 54 °C waren die Bedingungen streng genug, um diese Kreuzhybridisierung zu verhüten, hier kommt es nur noch zur spezifischen Hybridisierung Typ I cDNA - Typ I mRNA (Abb. 14) . In gleicher Weise wurden für pCol1 und p550 die Bedingungen für die Northern Hybridisierung optimiert. Für die Hybridisierung von pCol1 (α2(I)) genügte eine Hybridisierungstemperatur von 37 °C , um Kreuzhybridisierung mit Sterna mRNA zu verhindern.

Abb. 14: Hybridisierung von cDNA spezifisch für α1(I) Prokollagen mit RNA aus Kalvarien und Sterna von Tag 16 Hühnerembryonen. Die Proben wurden bei 37°C (54°C) 24 Stunden in 50% Formamid, 5x SSC, 10 mg/ml Glycin, 1mg/ml SDS, 0.2 mg/ml Ficoll 400, 0.2 mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 1 mg/ml Hefe tRNA hybridisiert.

Kalv: Kalvarien RNA (6µg)

Sterna: Sterna RNA (6µg)

Bei 54 °C und einer erhöhten Formamidkonzentration von 60% statt 50% in der Hybridisierungsmischung ergab sich keine Kreuzhybridisierung von p550 cDNA zu Kalvarien RNA

mehr. In Abb. 15 sind drei Northern Hybridisierungen für jeden der drei cDNA Klone gezeigt, bei denen keine Kreuzhybridisierung mehr vorkam.

Abb. 15: Northern Hybridisierung von RNA aus Kalvarien (1), Sterna (2a) und frisch isolierten Chondrocyten (2b) mit cDNA spezifisch für α1(I) Prokollagen (A), α2(I) Prokollagen (B) und das p550 Protein (C). Bedingungen wie bei Abb.14 bis auf folgende Parameter:

A: 54°C Hybridisierungstemperatur, 50% Formamid

B: 37°C Hybridisierungstemperatur, 50% Formamid

C: 54°C Hybridisierungstemperatur, 60% Formamid

3.3.2. Hauptexperiment: Hybridisierung von kollagenspezifischer cDNA zu Chondrocyten RNA Präparationen

Um die Veränderung der Menge einer spezifischen Prokollagen mRNA im Verlauf der sechswöchigen Kulturdauer der Chondrocyten zu verfolgen, wurden RNA- Proben von

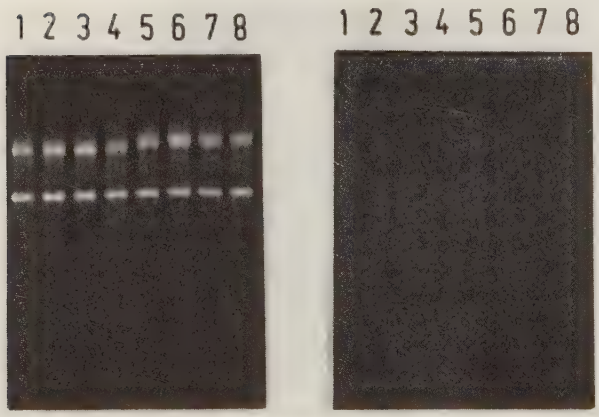


Abb. 16: Links: Agarose- Gelelektrophorese von RNAs aus Chondrocyten in verschiedenen Zuständen der Dedifferenzierung.

1: Chondrocyten- RNA, Tag 1, 6 µg 2: dito Tag 2

3: dito Tag 3 4: dito Tag 7

5: dito Tag 14 6: dito Tag 28

7: dito Tag 42 8: Kalvarien- RNA 6 µg

Rechts: Dasselbe Agarosegel nach dem Northern Transfer

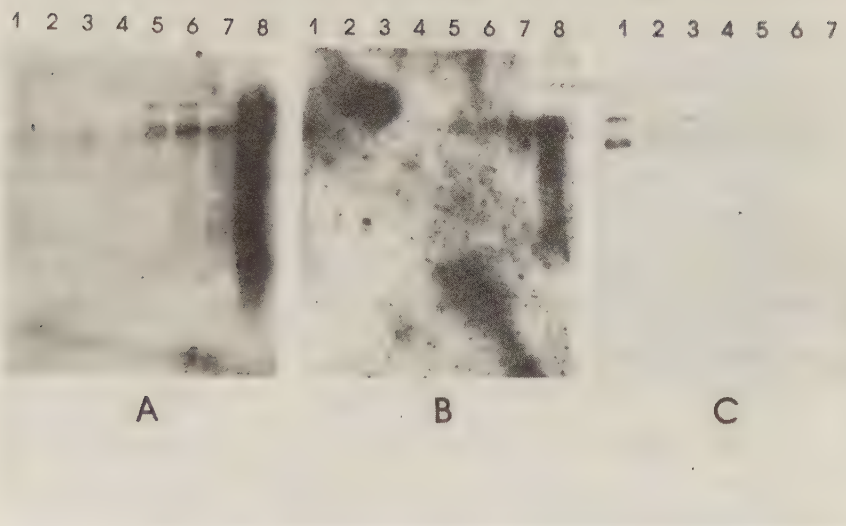


Abb. 17: Northern Hybridisierung von RNAs aus Chondrocyten in verschiedenen Zuständen der Dedifferenzierung

1 - 7: Chondrocyten steigender Kulturdauer (siehe Abb. 16) je 6 µg RNA

8: Kalvarien RNA, 6 µg

A: Hybridisierung mit cDNA spezifisch für α1(I) Prokollagen

B: Hybridisierung mit cDNA spezifisch für α2(I) Prokollagen

C: Hybridisierung mit der p550 cDNA (Sterna- spezifischer cDNA Klon)

Bedingungen siehe Abb.15

Chondrocyten verschiedener Kulturdauer nebeneinander hybridisiert. So wurden zunächst auf einem Agarosegel je 6 µg von RNA aus Chondrocytenkulturen von Tag 1, 2, 3, 7, 14, 28 und 42, dazu als Standard von Kalvarien elektrophoretisiert. Die Anfärbung mit Ethidiumbromid (Abb. 16)

zeigt hauptsächlich die Banden der 18S und 28S ribosomalen RNA. Es zeigte sich, daß die verschiedenen RNA- Proben praktisch die gleichen Mengen an 18S und 28S rRNA enthielten. Dies war entscheidend als Bezugspunkt für den Vergleich der RNAs, die aus Chondrocyten verschiedener Kulturdauer gewonnen worden waren. Es wurden nur solche Gele für Hybridisierungen verwendet, bei denen die 18S und 28S rRNAs für die verschiedenen Proben gleich starke Banden ergaben (visuelle Inspektion). Die RNA wurde dann wie beschrieben auf ein Filter transferiert und dort kovalent gebunden. Abbildung 16 zeigt das identische Agarosegel vor und nach dem Transfer. Man sieht, daß die Übertragung der RNA quantitativ abgelaufen ist. Dies war die zweite Bedingung für die Vergleichbarkeit der Proben bei der Hybridisierung. In gleicher Weise wurden mehrere Filter hergestellt und mit je 4 x 10^6 cpm von ^{32}P- markierter cDNA unter den oben beschriebenen spezifischen Bedingungen hybridisiert. Abb. 17 zeigt drei Autoradiogramme, Abb 17A eine Hybridisierung mit pCol3 (α1(I)), Abb. 17B eine Hybridisierung mit pCol1 (α2(I)) und Abb. 17C eine Hybridisierung mit p550. Die Autoradiogramme bestätigten eine Beobachtung, die schon bei der zellfreien Translation gemacht worden war: Die α1(I) Prokollagen mRNA trat schon früher auf als die Prokollagen α2(I) mRNA. Beide Spezies waren jedoch noch früher als in der zellfreien Translation zu erkennen, α1(I) mRNA schon am ersten Tag (Tag 3 in der zellfreien Translation) und α2 (I) mRNA schon an Tag 7

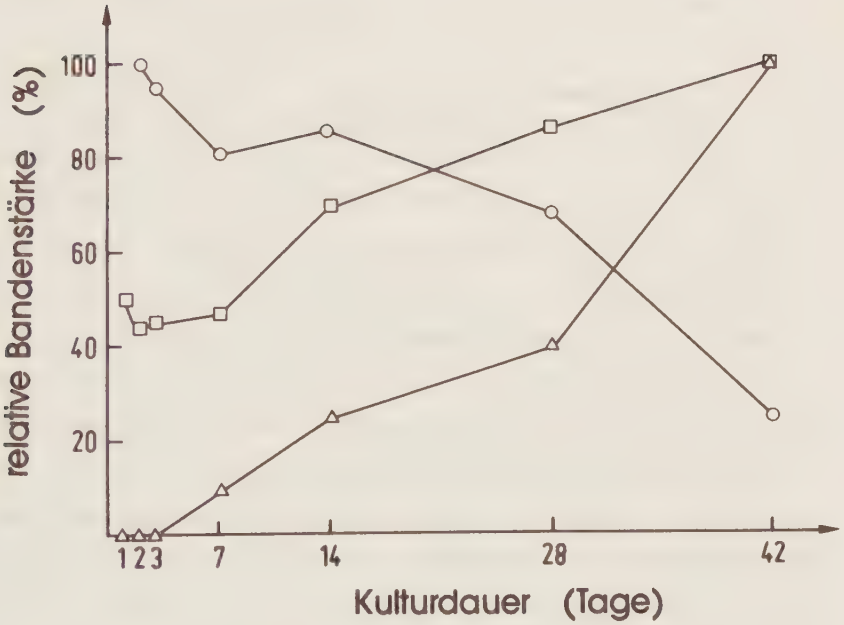


Abb. 18: Auswertung der Autoradiogramme (siehe Abb.17) der Northern Hybridisierung von Chondrocyten RNAs aus Chondrocyten verschiedener Kulturdauer mit verschiedenen cDNA Klonen

1: ▫—▪ Hybridisierung mit Prokollagen α1(I) cDNA

2: △—△ Hybridisierung mit Prokollagen α2(I) cDNA

3: ○—○ Hybridisierung mit p550 cDNA

1, 3: Durchschnitt der Auswertung von 2 Autoradiogrammen

2: Auswertung eines Autoradiogramms

(Tag 14 in der zellfreien Translation). Bei der mRNA, die von p550 cDNA erkannt wurde , stellte man eine stetige

Verringerung im Verlauf der Kulturdauer der Chondrocyten fest.

Um zu einer quantitativen Aussage zu kommen, wurden fünf Autoradiogramme im Densitometer vermessen. Dabei wurde Wert darauf gelegt, daß die starken Banden noch im linearen Bereich der Filmempfindlichkeit lagen. Die Absorptionsmaxima wurden ausgeschnitten und gewogen. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse: Die stärkste Bande ist für jede der drei mRNA Spezies gleich 100 gesetzt worden. Bei der graphischen Darstellung zeigt es sich eindeutig, daß die Bildung von α1(I) mRNA der Bildung von α2(I) mRNA vorausging bei der Einschaltung von Typ I Kollagen. Die mRNA, die zum Klon p550 hybridisiert, nahm im Verlauf der Umschaltung auf etwa 25% des Ausgangswertes ab.

3.4. Charakterisierung eines cDNA Klons (p550) aus mRNA von Knorpelgewebe

3.4.1. Gewinnung des Klons p550

Bei der Untersuchung der Kollagensynthese in Chondrocyten war im letzten Kapitel der cDNA Klon p550 als noch nicht näher charakterisierter cDNA Klon verwendet worden. Es hatte sich gezeigt, daß er unter bestimmten Bedingungen spezifisch mit Chondrocyten RNA hybridisierte. Die RNA-Spezies (zwei Banden), die er erkannte, fanden sich bei der Gelelektrophorese im Bereich der Prokollagen- mRNAs. Da also Hinweise darauf bestanden, daß es sich bei p550 um einen Prokollagen Klon handeln konnte, sollte dieser Klon näher charakterisiert werden.

Zuerst soll kurz die Gewinnung des Klons p550 geschildert werden, wie sie von Dr. P. Müller am NIH in Bethesda (USA) duchgeführt wurde. Um zu einer für Knorpelkollagen spezifischen cDNA zu kommen, wurde zunächst RNA aus Sterna von 17 Tage alten Hühnerembryonen gewonnen (vergl. Methodenteil). Die Prokollagen mRNA wurde durch oligo dT Cellulosechromatographie und Sucrosegradientenzentrifugation angereichert. Mit Hilfe von reverser Transkriptase wurde ein cDNA Strang synthetisiert, wobei oligo dT als Primer der Reaktion diente. Der zweite Strang wurde durch DNA Polymerase I synthetisiert. Die doppelsträngige cDNA wurde mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Hind III geschnitten und die entstehenden Fragmente zwischen

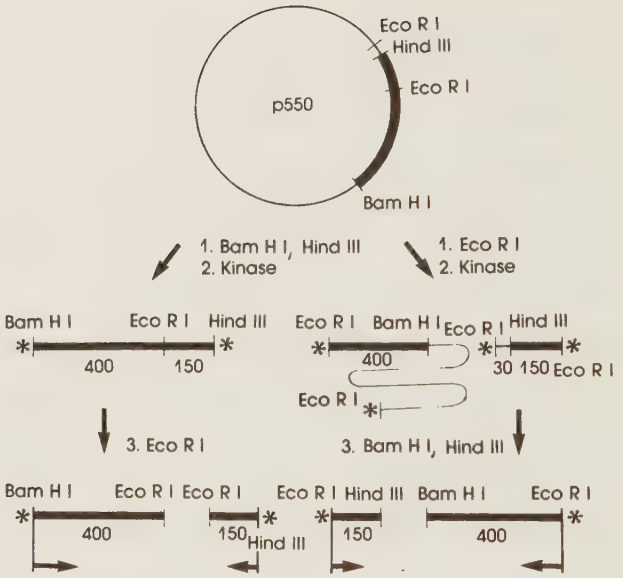


Abb. 19: Strategie für die Sequenzierung des p550 Inserts nach der Methode von Maxam und Gilbert

—— : Plasmid- DNA (aus pBR322)

▬▬ : p550- Insert

die Bam HI und Hind III Spaltstellen des Plasmidvektors pBR 322 eingebaut (Abb.19). Der Stamm E. coli C600 wurde mit den rekombinanten Plasmiden transformiert. Ein Klon mit

einem Insert von 550 Basenpaaren hybridisierte am besten zu Sterna mRNA in einem Kolonie- Screening Experiment und wurde deswegen weiter charakterisiert. Auf dieser Stufe wurden die Arbeiten übernommen.

3.4.2. Amplifizierung des Plasmids p550

E.coli C600 Bakterien wurden mit dem Plasmid p550 und als Kontrolle mit dem Plasmid pBR 322 transformiert wie im Methodenteil beschrieben. Für das Plasmid pBR 322 wurden 4 x 10^4 Kolonien/µg Plasmid- DNA gefunden, für das Plasmid p550 2 x 10^3 Kolonien/µg Plasmid- DNA.

Es sollte nun durch Koloniehybridisierung geprüft werden, ob die neu transformierten Bakterien das korrekte Plasmid enthielten. Fünf ampicillinresistente Kolonien von E.coli, die mit p550 transformiert worden waren, wurden in definiertem Muster auf zwei Ampicillin- Agarplatten mit Nitrocellulosefiltern überimpft. Im Zentrum der fünf p550 Kolonien wurde noch als Kontrolle eine pBR 322 Kolonie angeimpft. Über Nacht wuchsen Bakterienkulturen heran, die wie im Methodenteil beschrieben auf den Nitrocellulosefilter fixiert wurden.

Aus dem Plasmid p550 wurde das cDNA- Insert mit den Enzymen Bam HI und Hind III herausgeschnitten. Das cDNA Insert wurde gelelektrophoretisch isoliert und 1 µg der cDNA wurden mit 100 µCi (^{32}P)-dCTP durch Nicktranslation radioaktiv markiert. Die Ausbeute betrug 12.2 x 10^6 cpm.

Die beiden Nitrocellulosefilter wurden mit je 10^6 cpm

von (^{32}P)-markierter p550 cDNA hybridisiert.Ein Film wurde zusammen mit den gewaschenen und getrockneten Filtern 12 Stunden bei -70 ^{o}C inkubiert. Der Film zeigte eine starke Hybridisierung für die p550 - Kolonien, nicht jedoch für die Kolonie , die mit pBR 322 transformiert worden war (Abb.20). Von den Kolonien, die eine positive Hybridisierung zu p550 cDNA gezeigt hatten, wurde die am besten wachsende für die weiteren Untersuchungen verwendet.

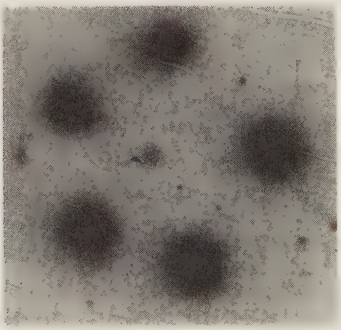


Abb. 20: Test neu transformierter Bakterienklone mit dem p550 Plasmid durch Koloniehybridisierung. Markiertes p550 cDNA- Insert wurde zu Kolonien hybridisiert, die mit dem p550 Plasmid transformiert worden waren (5 Kolonien der Peripherie). Als Kontrolle Hybridisierung zu einer Kolonie, die nur p550 enthielt (Zentrum)
Die Hybridisierung wurde 24 Stunden bei 65^{o}C in 1 x SSC mit 0.5% Sarcosyl durchgeführt.

Der selektierte Klon wurde in Luria Medium (+ 25 µg/ml

Ampicillin) angezüchtet, insgesamt in 4 x 0.6 l Kulturmedium. Aus den Zellen wurde wie im Methodenteil beschrieben eine rohe Plasmid- DNA gewonnen (Ausbeute ca. 150 µg/l Kulturmedium). Um eine möglichst reine Plasmid-DNA zu erhalten, wurde die rohe Präparation über eine Ethidiumbromid- Cäsiumchlorid- Dichtegradientenzentrifugation nachgereinigt (Abb.27). Jeweils 100 µg DNA wurden pro Röhrchen getrennt und lieferten auf diese Weise zwischen 30 und 40 µg gereinigtes Plasmid.

3.4.3. Gewinnung von DNA- Bruchstücken für die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert

Der Klon p550 war in einer Weise konstruiert worden, daß sein cDNA Insert an seinen Enden eine Bam HI und eine Hind III Spaltstelle besaß. Dies erlaubte die Isolierung des Inserts durch Spaltung des Plasmids p550 mit den Enzymen Bam HI und Hind III mit nachfolgender Polyacrylamidelektrophorese und Elution des Inserts nach Maxam und Gilbert (92).

Das isolierte Insert wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten. Von den Enzymen Bam HI, Eco RI, Hind III, Pst I, Sal I spaltete nur Eco RI das Insert. Bei der Eco RI Spaltung entstanden zwei Bruchstücke von etwa 150 bp und 400 bp Länge, geschätzt durch Vergleich mit einem Satz von DNA Längenmarkern (ΦX- Hae III- Bruchstücke). Es mußte nun herausgefunden werden, ob sich die EcoRI Spaltstelle näher an der Bam HI oder an der Hind III

Spaltstelle befand. Die Spaltung des Plasmids p550 mit Eco RI lieferte ein Bruchstück von etwa 180 bp und einen Rest größer als 4000 bp. Da die DNA- Sequenz von pBR 322 (93) eine Eco RI Spaltstelle 29 bp von der Hind III Spaltstelle entfernt aufweist, mußte die Eco RI Spaltstelle des Inserts etwa 150 bp von der Hind III Spaltstelle entfernt liegen. Dieser Befund wurde durch Verdauung des Plasmids mit den Kombinationen Eco RI mit Hind III und Eco RI mit Bam HI bestätigt.

Abb. 19 zeigt die Strategie, mit der passende Fragmente für die DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert gewonnen wurden.

3.4.4. DNA- Sequenzierung am cDNA Klon p550

Für die erste Spaltung wurden 30 µg gereinigte Plasmid DNA in einer 100 µl Reaktion mit Eco RI oder der Kombination von Bam HI und Hind III geschnitten. Das Protein wurde mit Phenol extrahiert und die DNA mit Alkohol gefällt. Endständige 5'- Phosphatgruppen wurden durch alkalische Phosphatase abgespalten und nach Denaturierung des Enzyms wurden die 5'-Enden mit T4- Polynukleotidkinase ^{32}P-markiert. Pro Reaktion wurden 400 µCi (γ-^{32}P)-ATP eingesetzt. Die Ausbeute lag bei etwa 8 x 10^6 cpm pro Ansatz. Dies entsprach etwa 2 x 10^5 cpm / pM DNA- Enden. Es folgte dann die zweite Spaltung mit den in Abb. 19 gezeigten Enzymen. Die markierte DNA wurde auf einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Banden durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die

markierten Fragmente wurden eluiert und alkoholgefällt. Die Ausbeute lag bei den verschiedenen Versuchen zwischen 25 und 50% der ursprünglich eingebauten Radioaktivität, zwischen etwa 5 x 10^5 und 10^6 cpm pro Fragment bei einem Ansatz von 30 µg Plasmid.

Die vier Reaktionen , die für G, G+A, C+T und C spezifisch sind, wurden bei jedem Ansatz durchgeführt. Dazu kam bei späteren Ansätzen die Reaktion A>C, die die Unterscheidung zwischen A und G bzw. C und T in einigen fraglichen Fällen ermöglichte. Die Reaktionsprodukte wurden auf 10 bzw. 20%igen Polyacrylamid- Harnstoffgelen aufgetrennt. Das höherprozentige diente zur Sequenzierung der ersten Basenpaare vom 5'- Ende eines Fragments und wurde dann bei 1400V elektrophoretisiert. Meist wurden dann drei 10%ige Gele verwendet, die bei 800V Spannung verschiedene Zeit laufen gelassen wurden. Bei der kürzesten Elektrophorese wanderte das Bromphenolblau ein Drittel der Strecke bis zum unteren Rand des Gels. Der mittellange Lauf wurde gestoppt, wenn das Bromphenolblau den unteren Rand erreicht hatte, der lange Lauf wurde beendet, wenn das Xylencyanol bis unten gewandert war. Die Gele wurden hernach wie beschrieben autoradiographiert. Die Abb. 21 zeigt ein repräsentatives Gel, das einen Teil der Sequenz vom Bam HI-Ende des 550 bp Inserts erkennen läßt. Die Sequenzen wurden mehrmals gelesen und von einer unabhängigen Person kontrolliert.

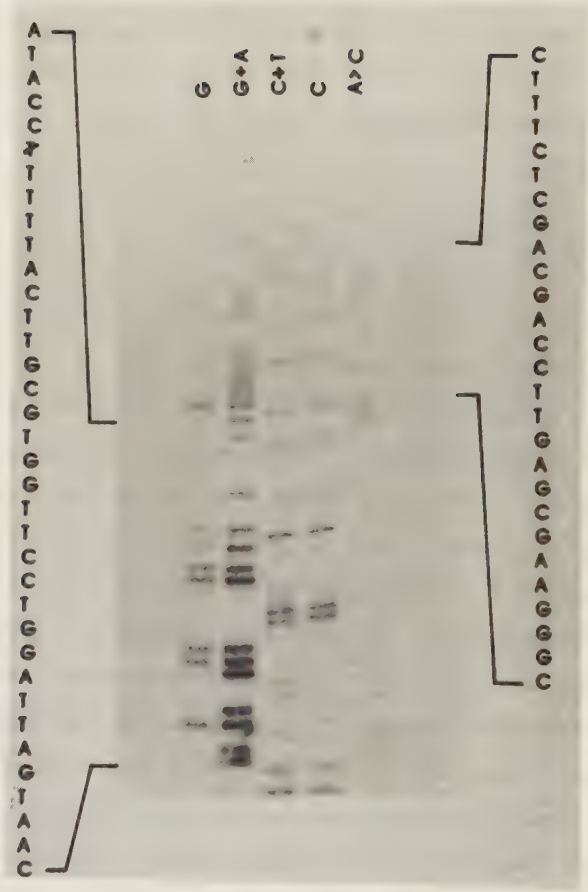


Abb. 21: Sequenzgel nach der Methode von Maxam und Gilbert DNA- Sequenz von bp 443 bis 503 gezählt in 5' - 3' Richtung vom Hind III zum Bam HI Ende hin

Beim Lesen der Sequenzgele gab es eine Fehlermöglichkeit, die sich durch den verwendeten Bakterienstamm E.coli C600 ergab (94). Dieser methyliert das zweite C der Eco RII Erkennungssequenz 5'CCAGG3' (5'CCTGG3'). Dieses C

p550 - Sequenz von 1-238

```
 AG CTT GGG CAA GCA TTG ACT GAA GTC TAT
    Leu Gly Gln Ala Leu Thr Glu Val Tyr

GCA AAG GCC AAC AGT TTT ACC GTC TCC TCG
Ala Lys Ala Asn Cys Phe Thr Val Ser Ser

GTC TCT GCC CCC TCT TGG CTT CAT CGT TTC
Val Ser Ala Pro Ser Trp Leu His Arg Phe

ATT ATT GGT TTG TTT GGT CAA AAC CTG GCC
Ile Ile Gly Leu Phe Gly Gln Asn Leu Ala

AAA ATA ACT CAG CAA ATG CCA AAG ATT CAC
Lys Ile Thr Gln Gln Met Pro Lys Ile His

ATC GAA TTC ACT GAA GGA GAG GAT AAA ATC
Ile Glu Phe Thr Glu Gly Glu Asp Lys Ile

ACT TCG GAA GGA CCT ACA GAA GAT GTG AAT
Thr Ser Glu Gly Pro Thr Glu Asp Val Asn

GTG GCT CAG GAA CAG ATT GAA GTC ATG G
Val Ala Gln Glu Gln Ile Glu Val Met
```

p550 - Sequenz von 423-550

```
CAG GGG GTC CAA CAG GCC AAG AAA GAG CTG
Gln Gly Val Gln Gln Ala Lys Lys Glu Leu

CTG GAA CTC GCT TCC CGT ATG GAA AAT GAA
Leu Glu Leu Ala Ser Arg Met Glu Asn Glu

CGC ACC AAG GAC CTA ATC ATT GAG CAG AAA
Arg Thr Lys Asp Leu Ile Ile Glu Gln Lys

TTC CAC CGG ACC ATC ATT GGG CAG AAG GGT
Phe His Arg Thr Ile Ile Gly Gln Lys Gly

GAG CGG AT
Glu Arg
```

Tabelle 3A: p550 Sequenz von 1 - 238 und 423 - 550, 5'-3' Richtung von der Hind III Spaltstelle auf die Bam HI Spaltstelle hin. Diese Leserichtung steht im Einklang mit dem Ergebnis des S1- Nukleaseexperiments in 3.4.5.

p550 - Sequenz von 550 - 423

```
ATG CGC TCA CCC TTC TGC CCA ATG ATG GTC
Ile Arg Ser Pro Phe Cys Pro Met Met Val

CGG TGG AAT TTC TGC TCA ATG ATT AGG TCC
Arg Trp Asn Phe Cys Ser Met Ile Arg Ser

TTG GTG CGT TCA TTT TCC ATA CGG GAA GCG
Leu Val Arg Ser Phe Ser Ile Arg Glu Ala

AGT TCC AGC AGC TCT TTC TTG GCC TGT TGG
Ser Ser Ser Ser Ser Phe Leu Ala Cys Trp

ACC CCC TG
Thr Pro
```

p550 - Sequenz von 239 - 1

```
 AC CAT GAC TTC AAT CTG TTC CTG AGC CAC
    His Asp Phe Asn Leu Phe Leu Ser His

ATT CAC ATC TTC TGT AGG TCC TTC CGA AGT
Ile His Ile Phe Cys Arg Ser Phe Arg Ser

GAT TTT ATC CTC TCC TTC AGT GAA TTC GAT
Asp Phe Ile Leu Ser Phe Ser Glu Phe Asp

GTG AAT CTT TGG CAT TTG CTG AGT TAT TTT
Val Asn Leu Trp His Leu Leu Ser Tyr Phe

GGC CAG GTT TTG ACC AAA CAA ACC AAT AAT
Gly Gln Val Leu Thr Lys Gln Thr Asn Asn

GAA ACG ATG AAG CCA AGA GGG GGC AGA GAC
Glu Thr Met Lys Pro Arg Gly Gly Arg Asp

CGA GGA GAC GGT AAA ACT GTT GGC CTT TGC
Arg Gly Asp Gly Lys Thr Val Gly Leu Cys

ATA GAC TTC AGT CAA TGC TTG CCC AAG CT
Ile Asp Phe Ser Gln Cys Leu Pro Lys
```

Tabelle 3B: p550 Sequenz von 550 - 423 und 238 - 1, 5'-3' Richtung von der Bam HI Spaltstelle auf die Hind III Spaltstelle hin

reagiert dann schlecht mit Hydrazin in den Maxam Gilbert Reaktionen und erscheint nicht als Bande in den Sequenzgelen. Beim Insert von p550 gab es eine Eco RII Spaltstelle. Den zugehörigen Ausschnitt aus dem Sequenzgel zeigt Abb.22. Die Lücke im Bandenmuster ist eindeutig zu erkennen und wurde als C gelesen.

Insgesamt gelang es, eine Teilsequenz von 366 Basenpaaren des Inserts von p550 zu ermitteln. Diese Sequenz ist in Tabelle 3 aufgeführt.

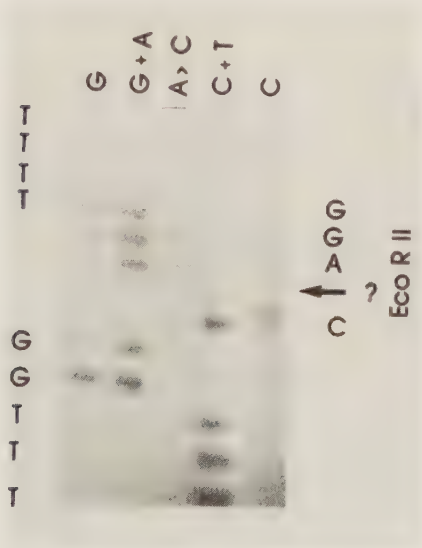


Abb. 22: DNA- Sequenzgel nach Maxam und Gilbert (Detail). In der Mitte der Sequenz der Eco RII Spaltstelle sind die beiden C- Banden nur sehr schwach ausgeprägt.

Die beiden DNA-Sequenzen von 128 und 238 Basenpaaren

Länge wurden in allen sechs möglichen Leserahmen in Proteinsequenzen übersetzt. Bei beiden Fragmenten gab es in beiden Leserichtungen je einen offenen Leserahmen. Die anderen Leserahmen enthielten alle eine unterschiedliche Zahl von Stopcodons. Die gefundenen Proteinsequenzen sind in Tabelle 3 ebenfalls aufgeführt. Abb. 23 zeigt die Restriktionskarte, die von der DNA- Sequenz abgeleitet wurde.

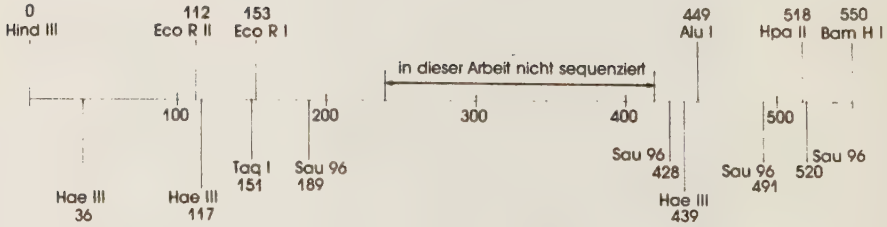


Abb. 23: Restriktionskarte des Inserts des Sterna- spezifischen cDNA Klons p550, bestimmt durch DNA- Sequenzierung nach Maxam und Gilbert

3.4.5. Untersuchung der Leserichtung der cDNA von p550 durch cDNA- mRNA Hybridisierung und Sl- Nukleaseverdauung

Um den codierenden Strang des Inserts von p550 zu bestimmen, wurde das Experiment durchgeführt, dessen Strategie in Abb. 24 dargestellt ist (vgl. 88). Es sollte eine Hybridisierung des codierenden Strangs der p550 cDNA mit Chondrocyten mRNA durchgeführt werden. Um herauszufinden, welcher Strang der cDNA mit der mRNA hybridisierte, wurden zwei verschieden lange markierte cDNA Fragmente benötigt, die von den beiden cDNA Strängen stammten. Diese konnten in der gleichen Weise gewonnen werden, wie bei der Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (Spaltung durch Eco RI, Endmarkierung mit Polynukleotidkinase, Nachspaltung mit Bam HI und Hind III und gelelektrophoretische Trennung). Diese cDNA Fragmente wurden nun denaturiert und zur Hybridisierung mit Chondrocyten mRNA eingesetzt. Die Verdauung der Hybridisierungsmischung mit Sl- Nuklease mußte nun entweder zu einem kürzeren oder längeren geschützten markierten Fragment führen, je nachdem ob das eine oder das andere markierte cDNA- Fragment hybridisiert hatte. Die entstehenden Produkte wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Abbildung 25 zeigt die Autoradiographie der Elektrophorese. Nur ein 150 bp Eco RI - Hind III Fragment wurde geschützt, das 400 bp Eco RI - Bam HI Fragment trat nicht mehr auf. Der geschützte Strang, der von 5' nach 3' in Richtung von der Eco RI auf die Hind III Spaltstelle verläuft, entspricht dem Minus-

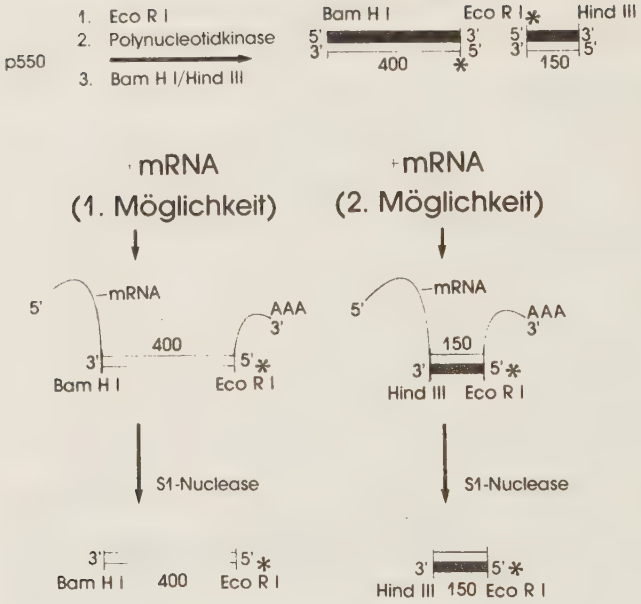


Abb. 24: Zwei ^{32}P- endmarkierte Fragmente unterschiedlicher Länge wurden aus p550 cDNA hergestellt (vergl. Abb. 19) und zu Sterna mRNA hybridisiert unter Northern Bedingungen. Je nachdem ob der dünn gezeichnete oder der dick gezeichnete Strang der cDNA mit der mRNA hybridisiert, tritt ein 400 bp oder ein 150 bp Fragment nach S1- Nukleasebehandlung auf. Zur Vereinfachung sind die nicht radioaktiv markierten Fragmente nicht gezeigt.

Strang, der komplementär zur RNA ist. Daraus folgt, daß die RNA in 5' - 3' Richtung von der Hind III in Richtung auf die Bam HI Spaltstelle abgelesen wird.

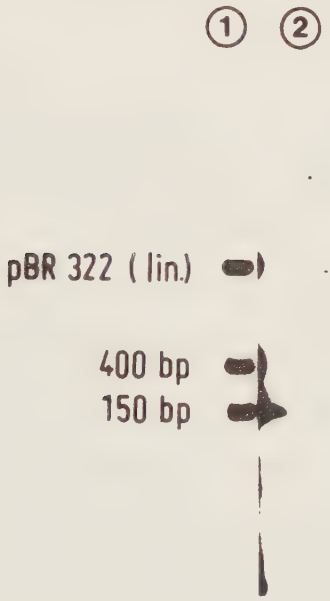


Abb. 25: Gelelektrophorese der nach dem Schema von Abb.24 gewonnenen Probe (2) und einem Standard (1). Die Abbildung wurde aus zwei Expositionen desselben Gels zusammengesetzt.

3.4.6. Vergleich der p550 Sequenz mit der Dayhoff-Datenbank von bekannten Protein- und Nukleinsäuresequenzen.

Die Übersetzung der DNA Sequenz des Klons p550 ergab in

keinem der möglichen Leserahmen längere $(Gly- X- Y)_n$ Sequenzen. Deshalb konnte p550 nur für terminale Bereiche von Kollagenmolekülen kodieren, nicht für tripelhelikale, immer unter der Annahme, daß es sich um einen Prokollagen cDNA Klon handelte.

Für die Carboxypropeptide von Typ I $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Prokollagen gibt es Sequenzdaten, die durch cDNA Sequenzierung gewonnen wurden (95). Ebenso ist die Sequenz des Aminopropeptids von $\alpha 1$(I) Prokollagen bekannt (91). Die p550 Proteinsequenz wurde mit allen diesen bekannten Sequenzen verglichen. Es konnte jedoch keine signifikante Verwandtschaft gefunden werden. Dies machte es höchst unwahrscheinlich, daß das p550 Protein Typ II Prokollagen oder ein anderes der eng verwandten interstitiellen Prokollagene war.

Um auszuschließen, daß p550 ein bereits bekanntes und sequenziertes nichtkollagenes Protein kodierte, wurde die p550 Sequenz sowohl auf der Proteinebene als auch auf der Nukleinsäureebene mit der Dayhoff Datenbank aller bekannten Protein- und Nukleinsäuresequenzen verglichen. Mit Hilfe des "Search" Programms wurden verwandte Teilsequenzen zu der p550 Sequenz aus der Datenbank herausgesucht und mit dem "Relate" Programm wurde die Bedeutung der gefundenen Verwandtschaft mit statistischen Methoden überprüft. Es wurden keine statistisch signifikanten Verwandtschaften gefunden.

4. Diskussion

4.1. Wahl des Versuchssystems

Wie die Untersuchung von erblichen Bindegewebserkrankungen gezeigt hat (96), muß jede Bindegewebszelle ganz spezifische Leistungen erbringen, um die Funktion des Gewebes zu gewährleisten, das sie aufbauen hilft. So muß sie die Synthese von Molekülen der Bindegewebsmatrix nach Art und Menge streng kontrollieren.

Diese Arbeit hatte die Aufgabe, zur Klärung der Regulation der Kollagensynthese beizutragen. Das System der Chondrocyten wurde gewählt, weil sich hier nicht nur in der Menge sondern auch in der Art des synthetisierten Kollagens Veränderungen abspielen.

Diese Vorgänge laufen bei längerer Kultur der Zellen reproduzierbar ab, ohne daß sie durch unphysiologische Agenzien erzwungen werden müssen. Deswegen eröffnet das Chondrocytensystem Aussichten, Informationen über die natürlichen Regulationsmechanismen von Bindegewebszellen zu gewinnen.

4.2. Untersuchung eines Faktors in konditioniertem Medium von Kalvarien, der die Umschaltung der Kollagensynthese in Chondrocyten beschleunigt.

Im physiologischen Zustand und im frisch isolierten Zustand in Zellkultur synthetisieren Chondrocyten Typ II

Kollagen. Kultiviert man die Zellen etwa vier Wochen lang, so wird die Produktion von Typ II Kollagen eingestellt und die Synthese von Typ I Kollagen aufgenommen. Dieser Vorgang der Dedifferenzierung läßt sich durch verschiedene Agenzien beschleunigen. Kalvarien in Gewebekultur geben einen Faktor ins Medium ab, der die Dedifferenzierung stark beschleunigt, sie verläuft unter dem Einfluß des Faktors in einer statt in vier Wochen (51). Da dieser Faktor ein natürliches Agens ist, mit dem man das Chondrocytensystem manipulieren kann, war es wünschenswert, ihn näher zu charakterisieren.

In einem Experiment wurde das von Kalvarien konditionierte Medium durch Ultrafiltration in verschiedene Fraktionen getrennt. Diese wurden dann im Chondrocytensystem auf ihre Aktivität bei der Beschleunigung der Umschaltung getestet. Der Faktor wurde durch ein Filter zurückgehalten, das Moleküle bis etwa 100000 Dalton passieren läßt. Es handelte sich bei dem Faktor also um eine hochmolekulare Komponente des konditionierten Mediums.

Eine Möglichkeit, den Faktor näher zu charakterisieren, bestand darin, mit verschiedenen chromatographischen Methoden Fraktionen des konditionierten Mediums zu gewinnen und diese im Chondrocytensystem auf ihre Aktivität zu testen. Dieser Weg wurde nicht beschritten, weil das Chondrocytensystem als Assaysystem zu langsam war. Stattdessen sollte mehr Information über den aktiven Faktor erhalten werden, indem das konditionierte Medium in Wechselwirkung mit Chondrocyten gebracht wurde. Dabei sollten

Komponenten gefunden werden,die selektiv an Chondrocyten angelagert oder von ihnen internalisiert wurden, mit der Möglichkeit, daß eine dieser Komponenten das aktive Prinzip war.

Die Syntheseprodukte von Kalvarien wurden mit ^{35}S-Methionin markiert. Die markierten Proteine wurden mit frisch isolierten Chondrocyten für verschiedene Zeiten in Kontakt gebracht.

Es zeigte sich, daß die Adsorption der Proteine etwa nach einer Stunde ein Plateau erreichte, die Zellen also äußerlich mit Komponenten aus dem konditionierten Medium gesättigt waren. Nach drei Stunden erreichte auch die internalisierte Menge an Radioaktivität ein Plateau, das höher lag als das Plateau der extrazellulären Radioaktivität. Diese Befunde sprechen dafür, daß die Proteine aus dem Kalvarien- konditionierten Medium nicht nur an die Chondrocyten angelagert wurden, sondern auch kurze Zeit später durch die Zellen aufgenommen wurden.

Die Komponenten, die mit Chondrocyten in Wechselwirkung traten, wurden mit Hilfe der Lämmli- Elektrophorese mit den Proteinen des konditionierten Mediums verglichen. Bei diesem Versuch bestand die Möglichkeit, daß sich der aktive Faktor durch selektive Wechselwirkung mit Chondrocyten zu erkennen gab. Der Versuch zeigte, daß von Kollagen Typ I die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Ketten (identifiziert durch Kochromatographie mit einem radioaktiven Standard) selektiv mit Chondrocyten in Wechselwirkung traten. Ein sich anschließendes Experiment

zeigte jedoch, daß Typ I Kollagen die Umschaltung der Chondrocyten nicht signifikant beschleunigte, also nicht das aktive Prinzip des konditionierten Mediums war. Die Exposition der Chondrocyten mit einem Kollagentyp, der in der Knorpelmatrix nicht vorkommt, reicht also nicht zur Umschaltung der Chondrocyten.

Die anderen in der Elektrophorese erkennbaren Proteine des konditionierten Mediums wurden etwa im gleichen Verhältnis an Chondrocyten angelagert, in dem sie im konditionierten Medium vorkamen. Dies wurde als eine unspezifische Adsorption gedeutet.

Da das Protein Fibronektin, das in konditionierten Medien von Fibroblasten vorkommt, die Umschaltung von Chondrocyten beschleunigt (59), konnte es auch im Kalvarien- konditionierten Medium das aktive Prinzip sein. Dazu paßte es, daß ein Protein im hochmolekularen Bereich an Chondrocyten adsorbiert wurde, wenn auch nicht selektiv. Ein Radioimmunassay auf Fibronektin im Kalvarien- konditionierten Medium fiel jedoch negativ aus. Daraus mußte die Folgerung gezogen werden, daß Fibronektin ebenfalls nicht das aktive Prinzip im Kalvarien- konditionierten Medium war.

Insgesamt schien der gesuchte Faktor nicht genug charakterisiert zu sein, um seine Wirkung bei der Modulation der Kollagensynthese sinnvoll näher zu untersuchen. Deswegen wurde die Untersuchung der Umschaltung der Chondrocyten auf der Ebene der Protein- Biosynthese und der mRNA von Kollagen weitgehend auf den Fall der spontanen Umschaltung

beschränkt.

4.3. Biosynthese des Kollagens bei Chondrocyten-

die Ebene des Proteins

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Umschaltung der Kollagensynthese in Chondrocyten auf der Ebene der mRNA. Die Frage lautete: Entspricht der Umschaltung von Typ II auf Typ I Kollagen eine Umschaltung der zugehörigen mRNA Spezies? Dazu war es notwendig, als Kontrolle einige Daten der Kollagenbiosynthese unter den gleichen Bedingungen zu gewinnen, die dann später bei der Messung der mRNA angewandt werden sollten.

Frisch isolierte Hühnerchondrocyten synthetisieren praktisch ausschließlich Typ II Kollagen (mehr als 90% der Kollagensynthese) . Nach der Umschaltung, d.h. nach etwa vier Wochen, synthetisieren sie etwa 90% Typ I Kollagen (49). Während der Umschaltung nimmt der Anteil der Kollagensynthese an der gesamten Proteinsynthese von etwa 20% auf etwa 5% ab (49). Da Typ I und Typ II Kollagen bei Chondrocyten vom Huhn eindeutig die Hauptprodukte der Kollagensynthese sind, wurden andere Kollagentypen wie zum Beispiel Typ III Kollagen nicht in die Betrachtung einbezogen.

Die Kollagenbiosynthese wurde untersucht, indem die Syntheseprodukte der Zellen von verschiedenen Stadien markiert wurden, dann das Kollgen isoliert und die α1 und α2 Ketten des Kollagens durch CM- Cellulosechromatographie getrennt

wurden. Diese Methode unterschied zwar $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Ketten, erlaubte aber nur die Bestimmung der $\alpha 1(I)$ und $\alpha 1(II)$ Ketten als Summe. Unter der Voraussetzung, daß Kollagen Typ I in Form von $(\alpha 1(I))_2 \alpha 2(I)$ und Kollagen Typ II als $(\alpha 1(II))_3$ vorlag, konnte aus dem $\alpha 1 : \alpha 2$ Verhältnis das Typ I : Typ II Verhältnis berechnet werden. Das Ergebnis der Untersuchung war, daß hauptsächlich im Zeitraum zwischen zwei und vier Wochen nach Isolierung der Zellen Typ I Kollagen zum Hauptprodukt der Kollagensynthese wurde. Die $\alpha 2(I)$ Kette trat jedoch schon nach einer Woche Kulturdauer auf.

Ein Phänomen entgeht bei der durchgeführten Methode der Beobachtung, das den Übergang der Kollagensynthese von Typ II auf Typ I betrifft. Die Anschaltung der Synthese von Typ I Kollagen verläuft zweistufig, die Bildung der $\alpha 1(I)$ Kette geht der Bildung der $\alpha 2(I)$ Kette voraus, so daß sich zunächst $\alpha 1(I)$- trimere Kollagenmoleküle bilden (22). Da die $\alpha 2(I)$ Kette bei den durchgeführten Versuchen schon nach einer Woche auftrat, war zu erwarten, daß $\alpha 1(I)$- trimere Kollagenmoleküle schon innerhalb der ersten Woche gebildet wurden. Das hat auch zur Folge, daß die Abschaltung der Synthese von Typ II Kollagen schneller verläuft, als mit der Methode der CM- Cellulosechromatographie gemessen wurde.

Bei der Untersuchung der Kollagenbiosynthese wurde auch geprüft, ob die Veränderung der Morphologie der Chondrocyten von einem polygonalen Typus zu einem spindelförmig- fibroblastoiden Typus parallel zur Umschaltung der Kollagen-

synthese verlief. Dies war der Fall, so daß es möglich war, durch Beobachtung der Zellen einer Kultur den Zustand der Kollagensynthese abzuschätzen. Dies ermöglichte die Kontrolle, ob die Zellen bei jedem Einzelversuch in der gleichen Geschwindigkeit umschalteten.

4.4. Die Umschaltung der Kollagensynthese bei Chondrocyten. Die Ebene der mRNA untersucht durch zellfreie Translation.

Bei diesen Experimenten wurden die Chondrocyten unter gleichen Bedingungen wie bei der Untersuchung der Kollagenbiosynthese bis zur Dedifferenzierung in Kultur gehalten. Aus den Zellen wurde in verschiedenen Stadien RNA isoliert.

Die Ebene der translatierbaren mRNA wurde durch die Methode der zellfreien Translation erfaßt. Die im zellfreien System synthetisierten Proteine konnten durch Gelelektrophorese und Fluorographie sichtbar gemacht werden. Die Prokollagen- α -Ketten wurden durch Immunpräzipitation identifiziert. Dabei war es von Bedeutung, daß alle drei α-Ketten von Typ I und Typ II Prokollagen separat bestimmt werden konnten.

Die zellfreie Translation zeigte eine Synthese von α1(I) Prokollagen mRNA ab Tag 3, von α2(I) Prokollagen mRNA ab Tag 14. Eine Synthese von α1(II) Prokollagen mRNA war am Tag 14 noch feststellbar, am Tag 28 nicht mehr. Hier zeigte sich also bei der zellfreien Translation von mRNAs

aus spontan umschaltenden Chondrocyten, daß es zur zweistufigen Einschaltung der Synthese von Prokollagen Typ I mRNA kam. Eine zur gleichen Zeit durchgeführte Arbeit untersuchte die beschleunigte Umschaltung mit BrdUrd (84). Auch unter den Bedingungen der forcierten Dedifferenzierung wurde die α1(I) mRNA vor der α2(I) mRNA gebildet.

Die Synthese von α1(I) Trimeren während der frühen Phase der Umschaltung der Chondrocyten wird also dadurch erzwungen, daß den Zellen nur α1(I) mRNA zur Verfügung steht. Der Mechanismus zur Bildung von α1(I) und α2(I) Ketten im korrekten Verhältnis von 2 : 1 tritt also wesentlich später in Funktion, als die erste Typ I Prokollagen mRNA gebildet wird. Die Bildung von Typ I Kollagenketten ist also unabhängig von dem Kettenauswahlmechanismus, der das α1 : α2 = 2 : 1 Verhältnis gewährleistet.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der zellfreien Translation, daß die Umschaltung auf der Ebene des Proteins (bestimmt durch die Untersuchung der Kollagenbiosynthese) parallel verläuft zur Umschaltung auf der Ebene der mRNA (bestimmt durch die indirekte Methode der zellfreien Translation). Die Synthese einer bestimmten Kollagenkette wird also in erster Linie durch die Anwesenheit der zugehörigen reifen mRNA bestimmt. Der Translationsapparat scheint bei diesem System nur der Übersetzung der mRNAs zu dienen, nicht der Auswahl der zu synthetisierenden Ketten.

Die Umschaltung von Typ II auf Typ I Kollagen scheint

nach den Ergebnissen der zellfreien Translation sich auf dem Gebiet der Transkription oder aber der Reifung der Prokollagen mRNAs zu einem translatierbaren Zustand abzuspielen.

4.5. Die Umschaltung der Kollagensynthese bei Chondrocyten. Die Ebene der mRNA untersucht durch mRNA- cDNA Hybridisierung (Northern Hybridisierung).

Hybridisiert man spezifische Prokollagen cDNA - Spezies unter Northern Bedingungen mit RNA aus Chondrocyten, so werden alle mRNA- Spezies mit den der cDNA entsprechenden Sequenzen erkannt. Dabei spielt der funktionelle Zustand der mRNA keine Rolle.

Die Methode der Northern Hybridisierung wurde in dieser Arbeit erstmalig auf das System der umschaltenden Chondrocyten angewandt, um die beiden spezifischen Typ I Prokollagen mRNA Spezies zu erfassen. Dabei wurden parallel angefertigte Filter mit kovalent gebundener RNA zu markierter cDNA hybridisiert, die spezifisch für α1(I) und α2(I) Prokollagen war. Das Ergebnis war, daß bei der Umschaltung der Chondrocyten die α1(I) spezifische mRNA schon am ersten Tag nach Isolierung der Zellen auftrat, die α2(I) spezifische mRNA am Tag 7. Das bedeutet, daß eine positive Hybridisierung mit den Typ I Prokollagen mRNA Spezies etwas früher gefunden wurde , als eine zellfreie Translation von Typ I Prokollagen. Dafür sind verschiedene Gründe denkbar:

1. Die Northern Hybridisierung könnte empfindlicher sein als die zellfreie Translation. Das würde auch dazu führen, daß die angeschalteten mRNA Spezies für Typ I Prokollagen früher erkannt werden als bei der zellfreien Translation.

2. Die Prokollagen mRNAs könnten in der Zelle einem Reifungsprozeß unterliegen, so daß zuerst unreife, nicht translatierbare mRNA gebildet wird (die durch die Northern Hybridisierung erkannt wird) die dann erst nach Ablauf einiger Tage translatierbar wird.

Die erste Deutung schien wahrscheinlicher, was am besten durch den Fall der α2(I) Kette demonstriert wird. Sowohl bei der Untersuchung der Kollagenbiosynthese als auch bei der Northern Hybridisierung trat diese Kette nach einer Woche auf. Da das Protein gebildet wird, muß auch eine reife RNA vorliegen, deren Konzentration jedoch nicht ausreichte, um in der zellfreien Translation eine sichtbare α2(I)-Bande zu liefern.

Auch auf der Ebene der Gesamt mRNA findet man also von der geringen Zeitverschiebung abgesehen, die Umschaltung auf Typ I Kollagen mRNA im Verlauf von etwa vier Wochen. Dabei ist α1(I) mRNA schon am ersten Tag nach Isolierung der Zellen nachweisbar, α2(I) mRNA erst nach einer Woche. Die Synthese von Typ I Prokollagen in Chondrocyten wird also angeschaltet, indem die Transkription von α1(I) und α2(I) mRNA angeschaltet wird. Durch welchen Mechanismus dies geschieht, ist mit den angewandten Methoden nicht beantwortbar und soll deswegen auch nicht weiter diskutiert werden.

Ein weiteres ungelöstes Problem ist die Hybridisierung der cDNA- Klone jeweils mit zwei mRNA Banden. Dabei erkennt der α1(I) Klon zwei gut getrennte Spezies, die im Verhältnis von etwa 3:1 vorliegen. Der α2(I) Klon erkennt zwei Spezies, die nur auf den hochauflösenden Hybridisierungsbildern als Doppelbande erscheinen. Die Verhältnisse der beiden Banden bleiben während der sechswöchigen Kulturdauer unverändert für beide cDNA Klone. Die Doppelbanden sind nicht spezifisch für das System der Chondrocyten, sie werden auch bei Northern Hybridisierung von Fibroblasten-RNA mit Kollagen cDNA gefunden (72). Die Beziehung zwischen den Banden ist nicht geklärt. Eine plausible Erklärung wäre, daß die höhermolekulare mRNA einen Vorläufer der niedrigmolekularen mRNA darstellt. Andererseits ist es auch möglich, daß beide Spezies reife mRNA darstellen, die sich nur in der Länge ihrer untranslatierten Region unterscheiden. Um einer Antwort auf die Frage der Beziehung zwischen den beiden mRNA Spezies näherzukommen, wird es zunächst notwendig sein,die Spezies zu trennen, um ihre Funktion zu testen.

Insgesamt zeigen also die Untersuchungen der mRNA-Konzentrationen in umschaltenden Chondrocyten, daß die mRNAs für Typ I Kollagen neu synthetisiert werden, wobei zuerst die α1 mRNA gebildet wird und später die α2 mRNA. Die Umschaltung der Kollagensynthese findet also in erster Linie auf der Ebene der Transkription statt und ist ein mehrstufiger Prozeß.

Bei den Northern Hybridisierungen wurde neben den charakterisierten Prokollagen cDNA Klonen der neu konstruierte cDNA Klon p550 eingesetzt, der aus Sterna mRNA abgeleitet war. P550 hybridisierte mit zwei mRNA Spezies aus frisch isolierten Chondrocyten, die im Bereich der Prokollagen mRNA in der Elektrophorese auftraten. Diese Hybridisierung nahm von frisch isolierten zu dedifferenzierten Chondrocyten auf 25% des Wertes für frisch isolierte Chondrocyten ab. Diese Befunde entsprechen weitgehend dem, was man für einen Prokollagen Typ II cDNA Klon erwarten sollte. Dewegen wurde der Klon p550 näher charakterisiert.

4.6. Charakterisierung des cDNA Klons p550.

Der cDNA Klon p550 wurde von Dr. Peter Müller am NIH in Bethesda (Maryland, USA) konstruiert. Er leitet sich ab von einer mRNA aus embryonalen Sterna, die auf Prokollagen mRNA angereichert worden war. Das Ziel des Projekts war die Isolierung eines für Typ II Prokollagen spezifischen cDNA Klons.

Der bei Beginn dieser Arbeit vorliegende Klon wurde zum Teil sequenziert. Es fand sich für beide Leserichtungen je ein offener Leserahmen für beide Fragmente. Eine Leserichtung wurde durch ein Hybridisierungsexperiment von markierten p550 Fragmenten zu Sterna mRNA als Leserichtung des p550 Proteins wahrscheinlich gemacht. Die Übersetzung der Sequenzen lieferte eine Aminosäuresequenz, die nicht aus Tripletts Gly-X-Y aufgebaut Die Aminosäuresequenz wies keine Ähnlichkeit mit der C- terminalen Sequenz von Prokollagen

Typ I (α1 und α2 Ketten) auf (95), ebensowenig mit der N- terminalen Sequenz der α1(I) Prokollagenkette (91).

Durch Vergleich mit der Dayhoff- Datenbank bekannter Protein- und Nukleinsäuresequenzen wurde sichergestellt, daß es sich bei der Sequenz von p550 um eine bisher noch unbekannte Sequenz handelte. Nähere Verwandtschaften zu bekannten Proteinen wurden nicht festgestellt.

So sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um p550 endgültig zu charakterisieren. Deswegen wurden in dieser Arbeitsgruppe Teile des p550 Gens isoliert und in λ - Phagen amplifiziert.

4.7. Medizinische Bedeutung der Ergebnisse

Bei der Osteoarthrose (63) wie bei der Umschaltung der Chondrocyten in Zellkultur kommt es zur Produktion eines falschen Kollagentyps (Typ I) anstelle des Knorpelkollagens (Typ II). In beiden Fällen wird die Umschaltung stark mitbeeinflußt oder sogar angestoßen durch die Änderung des Zustands der extrazellulären Matrix der Zellen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Dedifferenzierung der Chondrocyten ein Prozeß ist, der bis auf die Ebene der Transkription zu verfolgen ist, sich also im Zellkern der Chondrocyten abspielt. Das bedeutet, daß beim System der Chondrocyten die Signale der extrazellulären Matrix auch im Zellkern noch ihre Wirkung ausüben. Eine analoge Situation dürfte bei der Osteoarthrose vorliegen. Die Knorpelzellen wären dann als eine Zellart aufzufassen, die in ihrer

Genexpression so labil sind, daß eine Störung der extrazellulären Matrix (zB. Degradation durch entzündliche Prozesse, Abnutzung der Oberfläche des Knorpels) eine Umschaltung des Syntheseprogramms der Zellen bewirken kann. Daß diese Umschaltung sich auf der zentralen Ebene des Zellkerns abspielt, macht die Aufklärung der dabei ablaufenden molekularen Prozesse schwieriger. Eine Hoffnung bleibt für die fernere Zukunft, daß der kompliziertere Krankheitsprozeß mehr Angriffspunkte für eine kausale Therapie bietet.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Regulation der Proteinsynthese am Beispiel der Kollagensynthese für das System von Chondrocyten (Knorpelzellen) in Zellkultur untersucht. Chondrocyten aus Sterna embryonaler Hühner wurden sechs Wochen in Monolayerkultur gehalten. Während dieser Zeit dedifferenzierten sie, sie wurden fibroblastenähnlich gestreckt und schalteten parallel dazu die Kollagensynthese von Typ II Kollagen auf Typ I Kollagen um. Das erste Auftreten der α2- Kette von Typ I Kollagen wurde nach einer Woche beobachtet. Nach vier Wochen Kulturdauer hatten die meisten Zellen umgeschaltet.

Ein Faktor aus Kalvarien- konditionierten Medien wurde untersucht, der diese Umschaltung beschleunigt. Radioaktiv markiertes konditioniertes Medium wurde mit frisch isolierten Chondrocyten in Wechselwirkung gebracht. Aus dem konditionierten Medium wurde Kollagen Typ I an die Chondrocyten selektiv adsorbiert. Kollagen Typ I war jedoch nicht das aktive Prinzip.

Der Hauptteil der Arbeit befaßte sich mit der Untersuchung der mRNA, die von Chondrocyten in verschiedenen Stadien der Dedifferenzierung gebildet wird. Chondrocyten wurden wieder bis zur Dedifferenzierung in Monolayerkultur gehalten. Aus den Kulturen wurde zu bestimmten Zeitpunkten zwischen der Isolierung der Zellen und sechs Wochen später mRNA isoliert. Die Menge an mRNA, die spezifisch für α1(I)

und α2(I) Prokollagen war, wurde durch zellfreie Translation und Northern Hybridisierung mit spezifischer Prokollagen Typ I cDNA bestimmt. Die dedifferenzierenden Chondrocyten nahmen zuerst die Synthese von α1(I) Prokollagen mRNA, später die Synthese von α2(I) mRNA auf. Dieser zweistufige Mechanismus für den Beginn der Genexpression von Typ I Prokollagen war begleitet von einer Abnahme der Genexpression von Typ II Prokollagen, die durch zellfreie Translation der α1(II) Prokollagen mRNA verfolgt wurde. Insgesamt wurde eine weitgehende Parallelität der Umschaltung der Kollagenbiosynthese mit der Umschaltung der Produktion von Prokollagen mRNA gefunden.

Ein Chondrocyten- spezifischer cDNA Klon (p550) wurde ebenfalls in dieser Arbeit durch DNA- Sequenzierung und Northern Hybridisierung zu Chondrocyten mRNA charakterisiert. Das p550 Protein konnte nicht sicher identifiziert werden. Während der Dedifferenzierung der Chondrocyten nahm die Bildung der zu p550 hybridisierenden mRNA auf etwa 25% des Ausgangswertes ab.

Die durchgeführten Versuche zeigten, daß bei der Dedifferenzierung der Chondrocyten sich die Transkription der Gene für Prokollagen und für das p550 Protein veränderte. Die Dedifferenzierung ist also ein Prozeß, der direkt am Gen ansetzt, in mehreren Stufen verläuft und mehrere Genprodukte betrifft.

5. Materialien und Methoden

5.1. Materialien

5.1.1. Enzyme

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm) Boehringer, Mannheim; DNA- Polymerase (aus E.coli , Klenow Fragment) Boehringer, Mannheim; Lysozym (aus Hühnereiweiß) Boehringer, Mannheim; Pepsin (aus Schweinemagen) Boehringer, Mannheim; Polynukleotidkinase (aus T4 Phagen) Boehringer, Mannheim; Restriktionsenzyme Eco RI, Bam HI,Hind III, Boehringer Mannheim; Restriktionsenzym Sau 96 , Biolabs, Beverly, MA, USA; Ribonuklease (aus Rinderpankreas) Sigma, St.Louis, Mo, USA; S1 Nuklease (aus Aspergillus oryzae) Boehringer, Mannheim; Trypsin (aus Rinderpankreas) Seromed, München;

5.1.2. Radiochemikalien

(α- ^{32}P) dATP, (α- ^{32}P) dCTP, (γ- ^{32}P) ATP

L- 2,3- (^{3}H) Prolin, (^{35}S) Methionin

alle von Amersham Buchler, Braunschweig

5.1.3. Reagenzien

Acrylamid (4x krist.) Roth, Karlsruhe; Agarose (Seakem) FMC Corp., Rockville, ME, USA; Albumin (aus Rinderserum) Boehringer, Mannheim; Aprotinin (aus Rinderlunge) Boehringer, Mannheim; β-Mercaptoäthanol Roth, Karlsruhe; Dimethylsulfat EGA- Chemie, Steinheim; Ethidium-

bromid Sigma, St.Louis, MO, USA; Guanidiniumchlorid BRL, Rockville, MY, USA; Hydrazin Roth, Karlsruhe; N-Äthylmaleinimid Fluka, Buchs, Schweiz; Pansorbin (Staph. aureus Protein A) Calbiochem, LaJolla, CA, USA;

5.1.4. Sonstiges

Bakterienstamm E.coli C600 Geschenk von Dr. Benoit de Crombrugghe, Bethesda, MY, USA; Hühnerembryonen Hühnerbrüterei Hölzl, Moosburg; Retikulocytenlysat (aus Kaninchen) Amersham Buchler, Braunschweig.

5.2. Methoden

5.2.1. Biochemische und zellbiologische Methoden

zur Charakterisierung des Chondrocytensystems

5.2.1.1. Zellkultur von Chondrocyten

Sterna wurden aus Hühnerembryonen (Tag 16) isoliert und nach (60) mit Kollagenase- Trypsin 20 Minuten bei 37 ^{o}C vorverdaut, um perichondreale Zellen abzulösen. Die vorverdauten, mit PBS gewaschenen Sterna wurden dann mit Kollagenase -Trypsin desaggregiert. Für Kurzzeitkulturen (bis zum Tag 3) wurden die Zellen in einer Dichte von 3x 10^{7} Zellen pro Petrischale (Durchmesser 10 cm) ausgesät und in Ham's F10 Medium gehalten, das mit 10% foetalem Kälberserum, 20 uM Glutamin, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µg/ml Natriumascorbat angereichert war. Die Zellen wurden bei 37 ^{o}C in einer Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid gehalten. Für Langzeitkulturen wurden 10^{6}

Zellen pro 10 cm Petrischale ausgesät. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Genau nach zwei und nach vier Wochen Kulturdauer wurde ein Teil der Zellen in einem Verhältnis von 1:4 trypsiniert.

5.2.1.2. Radioaktive Inkubation der Zellen und Bestimmung des Verhältnisses von Typ I : Typ II Kollagen

Zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen Typ II und Typ I Kollagen und damit eines Parameters für die fortschreitende Umschaltung der Chondrocyten wurden die Zellen mit (^{3}H)- Prolin inkubiert. Das Inkubationsmedium, von dem 6 ml pro Petrischale zugegeben wurden, enthielt 5 µCi/ml (^{3}H)-L-Prolin, 50 µg/ml Natriumascorbat, 150 µg/ml β-Aminoproprionitril und 400 U/ml Penicillin G, jedoch kein Serum. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Zellrasen und Medium eines radioaktiv markierten Monolayers wurden vereinigt, mit 1 ml 1% EDTA und 0.5 ml Proteaseinhibitoren (3 mg/ml Phenylmethansulfonylfluorid und 3 mg/ml 4- Chloromercuribenzoesäure) versetzt und im Potter Homogenisator homogenisiert. Nach Zusatz von 50 mg lathyritischen Rattenhautkollagen als Träger (97) wurden die Proteine mit Ammoniumsulfat (40% Sättigung) über Nacht bei 4 °C gefällt. Der Niederschlag wurde 90 Minuten bei 29000 Upm abzentrifugiert, in 12 ml 0.5% Essigsäure suspendiert und über Nacht gegen 0.5% Essigsäure dialysiert. Darauf folgte eine Dialyse gegen 0.02 M Natriumacetat/ HCl pH 1.8, die einmal gewechselt wurde. Danach wurden die

globulären Proteine 6 Stunden bei 18 °C mit 0.1 mg/ml Pepsin verdaut (98). Der Pepsinabbau wurde durch Neutralisieren mit gesättigter Tris- Lösung und Abkühlen auf 4 °C gestoppt. Das Kollagen wurde dann bei 4 °C durch Dialyse gegen 17.5% KCl, 0.02 M Natriumdihydrogenphosphat pH 7.4 gefällt und am nächsten Tag 90 Minuten bei 29000 Upm abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 0.5% Essigsäure suspendiert und dann einmal gegen 0.5% Essigsäure und zweimal gegen CM-Startpuffer (1M Harnstoff, 20 mM Kaliumacetat pH 4.8) dialysiert (98, 99).

Zur Trennung der α-Ketten des isolierten Kollagens wurde eine CM (Carboxymethylcellulose-)chromatographie unter denaturierenden Bedingungen, d.h. einer Temperatur von 45 °C durchgeführt. Die gesamte Probe wurde nach der Denaturierung (20 Minuten, 45 °C) aufgetragen.

Temperatur der Säule: 45 °C

Gradient: 0-0.14 M LiCl in 1000 ml CM-Startpuffer

Durchfluß: 200 ml pro Stunde, aufsteigend

Fraktionen: 10 ml pro 3 Minuten

Die optische Dichte des Eluats (bei 226nm Wellenlänge) wurde im Beckman DB Spektrophotometer kontinuierlich gemessen. Zur Messung der Radioaktivität wurden 1 ml Aliquote mit Szintillationsflüssigkeit im Beckman LS 250 Zähler gezählt. Die Gesamtradioaktivität des α1 und des α2 Bereichs wurde bestimmt. Aus der Kettenzusammensetzung

$(\alpha 1(I))_2$ 2 für Typ I Kollagen und $(\alpha 1(II))_3$ für Typ II Kollagen ergibt sich nach (97, 99) die Formel

$$\% \text{ Typ II} = \frac{\alpha 1/\alpha 2 - 2}{\alpha 1/\alpha 2 + 1} \times 100\%$$

nach der der Anteil von Typ II Kollagen und damit auch Typ I Kollagen an den Kollagensyntheseprodukten der Zellen berechnet werden konnte.

5.2.1.3. Morphologische Untersuchung der Zellen

Das Aussehen der Zellen wurde im Wild Auflichtmikroskop beobachtet und photographisch festgehalten. Bei den Chondrocyten wurde nach verschiedenen Zeiten ein morphologischer Index bestimmt. Er stellt den prozentualen Anteil der gestreckten Zellen dar, wobei Zellen dann als gestreckt oder fibroblastoid aufgefaßt wurden, wenn ihre Länge mehr als doppelt so groß wie ihre Breite war.

5.2.1.4. Präparation von konditioniertem Medium

von Kalvarien

Kalvarien von 100 Hühnerembryonen (Tag 16) wurden 24 Stunden bei 37°C mit 50 ml Dulbecco's MEM (+400U/ml Penicillin G, +100µg/ml Streptomycin, +50µg/ml Ascorbat) inkubiert. Das Medium wurde viermal gegen PBS dialysiert, das erste Mal unter Zugabe von Penicillin G und Streptomycin. Das konditionierte Medium wurde darauf unter UV- Licht 20

Minuten lang sterilisiert.

Anteile des konditionierten Mediums wurden entweder sterilfiltriert oder unter sterilen Bedingungen durch Amycon XA100 oder XA50 Filter ultrafiltriert.

Radioaktiv markiertes konditioniertes Medium wurde in ähnlicher Weise hergestellt. Das Inkubationsmedium enthielt 10 μCi/ml ^{35}S Methionin. Das dialysierte und sterilfiltrierte konditionierte Medium enthielt eine Radioaktivität von 5.2×10^3 cpm/ml.

5.2.1.5. Bedingungen der Zellkultur von Chondrocyten bei den Experimenten mit konditionierten Medien von Kalvarien.

Die Chondrocyten wurden in einer Dichte von 10^4 Zellen pro Quadratzentimeter plattiert. Das Medium bestand zu 80% aus Ham's F10 Medium mit den üblichen Zusätzen und 20% konditioniertem Medium von Kalvarien. Es wurde am zweiten Tag nach der Isolierung der Zellen gewechselt.

Jeden Tag wurde der Anteil von fibroblastoiden Zellen ausgezählt. Jeweils drei Petrischalen pro getesteter Fraktion des konditionierten Mediums wurden gezählt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt und Durchschnitte der erhaltenen Werte wurden berechnet.

5.2.1.6. Adsorption und Internalisierung von Faktoren aus Kalvarien- konditioniertem Medium durch Chondrocyten.

Chondrocyten wurden in Petrischalen von 10 cm Durchmesser in einer Dichte von 10^5 Zellen pro Quadratzentimeter plattiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen verschiedene Zeiten (10 Minuten, 30 Minuten, eine Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden) mit je 3 ml = 1.56 x 10^4 cpm von ^{35}S-markiertem konditionierten Medium behandelt.

Nach der Inkubation wurde ein Teil der Zellen fünfmal mit je 3 ml PBS gewaschen, mit zweimal 3 ml 1M NaCl, 0.05M Tris, pH 7.4 abgekratzt und dreimal 10 Sekunden Ultraschallhomogenisiert. Danach wurden die Proben dreimal gegen 0.5% Essigsäure dialysiert, lyophilisiert und in einem Volumen von 50 µl Laemmli- Auftragspuffer gelöst. Aliquote wurden gezählt.

Ein zweiter Teil der Zellen wurde nach der Inkubation mit dem konditionierten Medium 5 Minuten bei 25°C mit 0.25% Trypsin behandelt, danach wie oben mit PBS gewaschen und weiterbehandelt.

5.2.2. Methoden zur Untersuchung von Kollagen mRNA von Chondrocyten

5.2.2.1. RNA- Extraktion

Aus den Chondrocyten wurde nach verschiedener

Kulturdauer RNA nach der Guanidiniumchloridmethode (87, 100) extrahiert. Die Zellen wurden viermal mit PBS gewaschen und nach Absaugen überschüssiger Flüssigkeit mit einem möglichst geringen Volumen von 8 M Guanidiniumchlorid, 10 mM Natriumacetat pH 5 lysiert. Das Lysat wurde mit 12 Zügen in einem Dounce (B) Homogenisator homogenisiert. Reste von Zelldetritus wurden durch 5 Minuten Zentrifugation bei 5000 Upm und 4 °C abgetrennt. Aus dem Überstand wurde durch Zugabe von einem halben Volumen Äthanol RNA ausgefällt. Die Fällung dauerte 30 Minuten bei -20 °C bis -30 °C, die RNA wurde dann 30 Minuten bei 4 °C und 5000 Upm abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde danach noch zweimal in 8 M Guanidiniumchlorid, 20 mM EDTA, 10 mM Natriumacetat pH 5 gelöst, wie oben gefällt und abzentrifugiert. Als Niederschlag wurde eine angereicherte RNA- Fraktion erhalten, die in einem möglichst geringen Volumen von 20 mM EDTA gelöst wurde. Die Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform- Isobutanol (4:1) extrahiert. Die Chloroform-Isobutanolphase wurde mit wenig 20 mM EDTA rückextrahiert. Die wäßrigen Phasen wurden vereinigt und auf 3 M Natriumacetat pH 5 gebracht und bei -15 °C über Nacht gehalten. Dadurch wurde die RNA wieder gefällt und konnte durch eine Stunde Zentrifugation bei 4 °C und 5000 Upm als Niederschlag erhalten werden. Die RNA wurde dann nochmals in etwa 3 ml bidest. Wasser aufgelöst, äthanolgefällt und in einer Konzentration von 1 µg/ul in bidest. Wasser gelöst und bei -80 °C aufbewahrt.

Zwischen 20 und 35 Petrischalen (10 cm Durchmesser)

wurden in einem typischen Experiment verwendet. Die Ausbeute lag zwischen 2 und 8 µg RNA pro 10^6 Zellen.

Als Standard für die zellfreie Translation wurde RNA direkt aus Sterna und Kalvarien von 16 Tage alten Hühnerembryonen nach derselben Methode gewonnen. Die Lyse des Gewebes im Guanidiniumchloridpuffer erfolgte durch 3 x 12 Sekunden Homogenisierung bei höchster Geschwindigkeitsstufe in einem Polytron Homogenisator. Darauf folgten die gleichen Fällungsschritte wie bei der Präparation von RNA aus Zellen. Die Kalvarien- RNA, die in dieser Weise gewonnen wurde, konnte ohne weitere Reinigung verwendet werden, um im zellfreien Translationssystem Prokollagen Typ I zu bilden. Im Fall von Sterna RNA waren zwei weitere Reinigungsschritte notwendig , um eine Präparation zu erhalten, die im zellfreien System Prokollagen Typ II bildete. Zuerst wurde Sterna mRNA durch Affinitätschromatographie an oligo dT Cellulose angereichert (101). Die erhaltene Fraktion (etwa 10% der Ausgangsmenge von RNA) wurde weiter über Sucrosegradientenzentrifugation (Abb. 26) gereinigt (102). Translationsexperimente mit einzelnen Fraktionen (unpublizierte Daten Dr. P. Müller) hatten gezeigt, daß Typ II Prokollagen mRNA etwas schneller als 28S rRNA sedimentiert und deshalb in der abfallenden Schulter des 28S- rRNA Absorptionsmaximums zu finden ist. Die Fraktionen in diesem Bereich wurden vereinigt und alkoholgefällt. Die Ausbeute betrug etwa 25% der eingesetzten RNA nach odT-Cellulosechromatographie, insgesamt etwa 30 µg pro 100 Sterna.

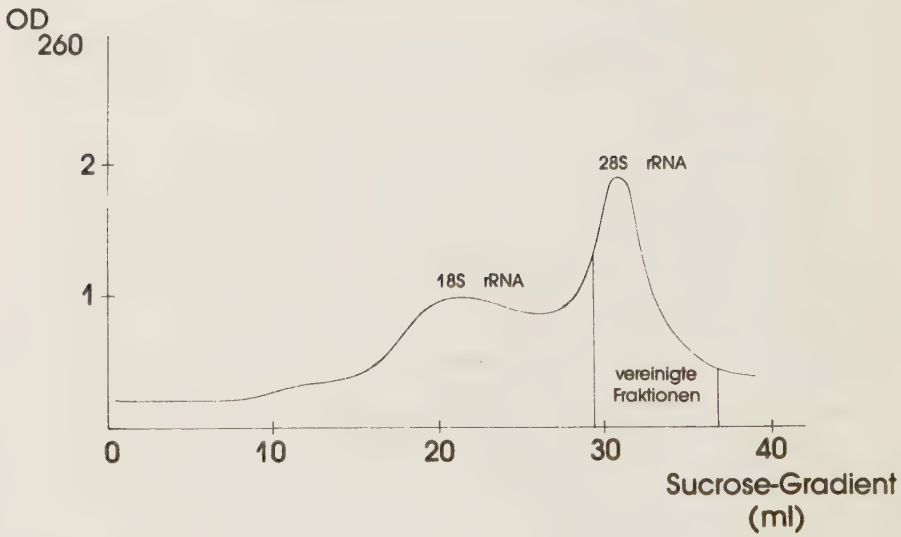


Abb. 26: Sucrosegradientenzentrifugation von RNA aus Sterna (Tag 16 Hühnerembryonen), die durch odT- Cellulosechromatographie auf mRNA (oligo A^+) angereichert worden war. Der markierte Bereich enthält die Prokollagen Typ II mRNA.

5.2.2.2. Zellfreie Translation

mRNA- Präparationen von Sterna, Kalvarien oder Chondrocytenkulturen wurden in einem käuflichen Retikulocytenlysatsystem in Protein translatiert. Die RNA- Proben (0.2 - 1.0 µg) in 6 µl von 50 mM Kaliumchlorid wurden 2 Minuten auf 70 ^{o}C erhitzt, im Eisbad abgekühlt und 19 µl von Mastermix wurden zugegeben. Der Mastermix enthielt das aufgetaute Retikulocytenlysat mit 1 µCi/µl (^{35}S)-

Methionin und 70 µM der restlichen 19 Aminosäuren in nicht-radioaktiver Form. Die Proben wurden nach Zugabe des Mastermix 90 Minuten bei 30 °C inkubiert.

5.2.2.3. Kollagenaseabbau

Bakterielle Kollagenase war nach (4) gereinigt worden, um die unspezifische Proteaseaktivität auf ein Minimum zu reduzieren. Aliquote der Proben nach zellfreier Translation wurden 5 Minuten bei 37 °C mit dieser gereinigten Kollagenase behandelt (Bedingungen wie in (4)).

5.2.2.4. Immunpräzipitation der Produkte der zellfreien Translation

Um Prokollagen Typ I und II als zellfreie Translationsprodukte zu identifizieren, wurde eine Immunpräzipitation ähnlich wie in (103) durchgeführt. 15 µl der Reaktionsmischung nach zellfreier Translation wurden mit 2 µl von Pankreasribonuklease (1 mg/ml) in 3.5% Natriumdeoxycholat, 3.5% Nonidet P40, 35 mM EDTA, 1 mg/ml Aprotinin pH 7.0 15 Minuten bei 30 °C behandelt, um Ribonukleinsäuren abzubauen. 6 µl von 8% Nonidet P40 plus 8% Natriumdeoxycholat wurden zugegeben. Die Mischung blieb 5 Minuten auf Eis stehen und wurde dann 5 Minuten bei 12000 Upm in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Der kaum sichtbare Niederschlag wurde verworfen. Für die eigentliche Immunpräzipitation wurde der Überstand zu 100 µl von Puffer A (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 0.05% Nonidet P40, 0.25% Natriumdeoxycholat, 0.01% SDS, 1 mg/ml Rinderserumalbumin, 2 mM

Methionin, 20 mM ε- Aminocapronsäure, 2.5 mM Benzamidin und 10 mM Natriumiodoacetat pH 7.5) zugegeben. 3 µl von Antikörperlösung wurden zugegeben und die Mischung über Nacht bei 4 °C gelassen. 200 µl von Staphylokokkus Protein A (Pansorbin),das vorher mit Puffer A (ohne die drei Proteaseinhibitoren) äquilibriert worden war, wurden zugegeben und die Mischung 2 Stunden bei 4 °C gelassen. Die Pansorbin- Antikörper- Antigen Komplexe wurden durch zehnminütige Zentrifugation bei 4 °C und 4000 Upm niedergeschlagen. Die Niederschläge wurden dreimal mit je 300 µl Puffer A (ohne Inhibitoren) gewaschen. Der letzte Niederschlag wurde in 100 µl Auftragspuffer für die Gelelektrophorese (4% SDS, 6 M Harnstoff, 0.125 M Tris/HCl, 0.025% Bromphenolblau pH 6.8) suspendiert, 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und 5 Minuten bei 12000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden sofort auf Polyacrylamidgele geladen. Auf parallelen Bahnen wurden Aliquote der Originalprodukte der zellfreien Translation in demselben Auftragspuffer elektrophoretisiert.

5.2.2.5. Gelelektrophorese und Fluorographie

Die Proben von der zellfreien Translation, dem Kollagenaseabbau oder der Immunpräzipitation von zellfrei translatierten Proben wurden auf 7% Polyacrylamidgelen mit 4% Sammelgelen elektrophoretisiert (104). Die Gele wurden mit 20% Trichloressigsäure fixiert und mit PPO nach (105) für die Fluorographie imprägniert. Die Filme wurden bei -70 °C zwischen 2 Tagen bei Kontrollexperimenten und 21

Tagen bei den Gelen der Immunpräzipitation exponiert.

5.2.2.6. Gewinnung von radioaktiv markierter DNA für die Northern Hybridisierung

Aus Plasmid- DNA wurden die cDNA Stücke durch Restriktion mit den Enzymen Bam HI und Hind III herausgeschnitten. Die Inserts wurden durch Gelelektrophorese in 8%igen Polyacrylamidgelen abgetrennt (106) . Die DNA wurde mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) 20 Minuten bei Raumtemperatur angefärbt. Die DNA- Banden wurden ausgeschnitten und wie unter 5.2.3.7. beschrieben eluiert und isoliert.

Die gereinigten Fragmente wurden durch Nicktranslation nach (107) radioaktiv markiert. DNAse erzeugte Einzelstrangbrüche in der DNA. DNA- Polymerase I (Kornberg Polymerase) inkorporierte danach (α-^{32}P)- Deoxynukleotide um diese Spaltstellen herum. Bei Verwendung eines Deoxynukleotids hoher spezifischer Aktivität (> 2000 Ci/mmol) wurde die DNA mit einer Ausbeute von 10^7 cpm/µg eingesetzter DNA markiert.

5.2.2.7. Herstellung von Northern-Papier für die DNA-RNA Hybridisierung nach (85)

Whatman 540 Papier wurde zu Rechtecken von 12 x 22 cm zugeschnitten und bei 60 ^{o}C in einer Glasschale mit 10 ml von einer frisch bereiteten wäßrigen Lösung von 1 g NBPC und 0.25 g Natriumacetat behandelt, bis das Wasser verdunstet war. Durch mechanische Manipulation des Papiers wurde die

Lösung immer gleichmäßig verteilt gehalten. Die Papiere wurden 30 Minuten bei 130 °C nachgetrocknet, danach 2 x 10 Minuten mit Wasser bei Raumtemperatur gewaschen und bei 60 °C getrocknet. Dann wurden die Papiere 2 x 10 Minuten in Benzol bei Raumtemperatur gewaschen und luftgetrocknet (30 Minuten). Es folgte eine Reduktion der Nitrogruppen in 20% Natriumdithionit (w/v) 30 Minuten bei 60 °C. Die Papiere wurden danach 2 x 10 Minuten mit Wasser, dann einmal 15 Minuten mit 30%iger Essigsäure gewaschen. Danach wurden sie unter fließendem Wasser gespült, bis kein Geruch mehr wahrnehmbar war und dann an der Luft getrocknet und bei 4 °C unter Stickstoff aufbewahrt.

Unmittelbar vor dem Transfer wurde das Papier zur gleichen Größe wie das Agarosegel mit den elektrophoretisierten RNA-Proben (siehe 5.2.2.8.) zugeschnitten. In 120 ml 1 M HCl mit frisch zugegebenen 32 mg Natriumnitrit wurden die Aminogruppen 30 Minuten im Eisbad diazotiert. Die Papiere wurden dann dreimal je drei Minuten mit eiskaltem Wasser gewaschen, dann dreimal kurz mit Transferpuffer (20 mM Kaliumphosphat pH 6.8) und unmittelbar darauf zum Transfer eingesetzt.

5.2.2.8. Northern Transfer (72, 85)

RNA-Proben aus Chondrocyten oder Hühnerkalvarien (6 µg pro Probe) wurden in einem 4 mm dicken Flachgel aus einprozentiger Agarose mit 6 mM Methylquecksilberhydroxid zweieinhalb Stunden bei 60 mA elektrophoretisiert. Als Laufpuffer wurde BSE- Puffer verwendet. Um die RNA zu transferierbaren

Bruchstücken zu hydrolysieren, wurden die Agarosegele zweimal zehn Minuten in 50 mM Natriumhydroxid, 1 µg/ml Ethidiumbromid, 0.07% (v/v) Mercaptoäthanol behandelt, danach in 200 mM Kaliumphosphat, 2 mg/ml Natriumiodoacetat pH 6.8 neutralisiert und mit dem Transferpuffer 20 mM Kaliumphosphat pH 6.8 dreimal fünf Minuten äquilibriert. Das Gel wurde dann auf 10 Lagen von Whatman 3MM Papier, gesättigt mit Transferpuffer, gelagert. Das diazotierte Northern-Papier wurde aufgelegt. Es folgten noch zwei Lagen von Whatman 3MM Papier, die ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtet waren und etwa 3 cm trockene Papierhandtücher, die zur gleichen Größe zugeschnitten waren. Der ganze Aufbau wurde in Frischhaltefolie eingepackt und mit etwa 500 g Gewicht beschwert. Innerhalb von etwa 18 Stunden wurden dann die RNA-Bruchstücke mit dem aufsteigenden Transferpuffer auf das Northern- Papier mitgenommen und dort kovalent fixiert. Die erhaltenen Filter wurden maximal dreimal zu Hybridisierungen verwendet. Zur Regeneration wurden die Filter 5 Minuten mit 99% Formamid bei 70 °C behandelt, eine Minute mit 1 x SSC gewaschen und luftgetrocknet.

5.2.2.9. Northern Hybridisierung (72, 85)

Nach dem Transfer wurden die Agarosegele nochmals mit Ethidiumbromid gefärbt und auf die Vollständigkeit des Transfers geprüft. Die Northern- Filter mit der kovalent gebundenen RNA wurden in einem Formamid- haltigen Prähybridisierungspuffer (50% Formamid, 5 x SSC, 10 mg/ml Glycin, 1 mg/ml SDS, 0.2 mg/ml Ficoll 400, 0.2 mg/ml Polyvinyl-

pyrrolidon, 1 mg/ml Hefe tRNA) 3 Stunden bei 37 °C in einem Plastikbeutel prähybridisiert. Die radioaktiv markierte DNA in wäßriger Lösung wurde 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und direkt in den Plasikbeutel eingebracht.

Bei der nun folgenden Hybridisierung wurden für die verschiedenen DNA Proben verschiedene Bedingungen gewählt: Die α1(I) Prokollagen DNA (pCol 3) wurde 24 Stunden bei 54 °C hybridisiert, die α2(I) DNA (pCol 1) 24 Stunden bei 37 °C. Die p550 DNA wurde 24 Stunden bei 54 °C in einem Hybridisierungspuffer von 60% statt 50% Formamid hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Filter viermal zehn Minuten in 1 x SSC, 1 mg / ml SDS, 1 mM EDTA gewaschen, die Filter , die mit pCol 1 hybridisiert worden waren, bei 37 °C, alle anderen bei 54 °C. Danach wurden die Filter luftgetrocknet und bei -70 °C mit Verstärkerfolie etwa 5 Tage lang autoradiographiert. Die entwickelten Filme wurden mit einem Zeiss PMQ 3 Photometer bei 550 nm Wellenlänge vermessen. Die auf Papier registrierten Absorptionsmaxima wurden ausgeschnitten und gewogen.

5.2.3. Methoden zur Charakterisierung des Plasmids p550

5.2.3.1. Transformierung von E.coli C600

Zur Amplifizierung des Plasmids p550 wurden Bakterien des Stamms E.coli C600 transformiert (108). E.coli C600 Bakterien wurden von einer Übernachtkultur angeimpft und bei 200 Upm und 37 °C geschwenkt bis eine optische Dichte (bei 600 nm) von 1.0 erreicht war (etwa nach 2 Stunden). 40 ml

wurden entnommen und 10 Minuten bei 7000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die abzentrifugierten Bakterien wurden so vorsichtig wie möglich in eiskaltem 50 mM Calciumchlorid resuspendiert und 15 Minuten auf Eis gelassen. Danach wurden sie nochmals wie oben zentrifugiert und in 4 ml kaltem 50 mM Calciumchlorid resuspendiert. In vorgekühlten Reagenzgläsern wurden zu 200 µl Bakteriensuspension loo µl TCM- Puffer (10 mM Tris/HCl 10 mM Calciumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid pH 7.0) zugesetzt und hernach entweder Plasmid-DNA in wäßriger Lösung oder Wasser als Kontrolle. Die Mischungen wurden unter gelegentlichem Schütteln 25 Minuten auf Eis gehalten, 2 Minuten auf 37 °C erwärmt und 10 Minuten bei Raumtemperatur gelassen. 1 ml von Luria Medium wurde zugesetzt und die Reagenzgläser wurden 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien auf Agar-Petrischalen plattiert. Die Agarplatten enthielten entweder kein Antibiotikum, Tetracyclin (10 µg/ml) oder Ampicillin (25 µg/ml). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die entstandenen Kolonien gezählt.

5.2.3.2. Koloniehybridisierung

Von den Bakterienkolonien, die auf den antibiotikahaltigen Agarplatten gewachsen waren, wurden bestimmte selektiert und eine geringe Zahl von Bakterien auf eine Agarplatte mit Nitrocellulosefilter angeimpft. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C gehalten und am nächsten Tag wurde die DNA der gewachsenen Bakterienkolonien fixiert (109): Die Nitrocellulosefilter wurden von unten 5 Minuten mit 0.5 M

NaOH , dann zweimal je eine Minute mit 1 M Tris/HCl pH 7.4, danach einmal 5 Minuten mit 0.5 M Tris/HCl, 1.5 M NaCl pH 7.4 durchfeuchtet. Danach wurden die Filter mit den nunmehr fixierten Kolonien 45 Sekunden mit 95% Äthanol, zweimal je eine Minute mit Chloroform, danach kurz mit 0.3 M NaCl behandelt, zwischen Filterpapiere gepreßt und 2 Stunden bei 80 ^{o}C im Vakuumexsikkator getrocknet.

Die Nitrocellulosefilter wurden im Plastikbeutel mit 3 ml 1x SSC mit 1% Sarcosyl eine Stunde bei 65 ^{o}C prähybridisiert (110). Radioaktiv markierte DNA (ca. 10^{6} cpm/Filter) wurde in 2 ml 1x SSC mit 1% Sarcosyl 5 Minuten bei 70 ^{o}C denaturiert. Die Prähybridisierungslösung wurde aus den Beuteln mit den Filtern abgesaugt und durch die Lösung der denaturierten , markierten DNA ersetzt. Die Hybridisierung wurde 24 Stunden bei 65 ^{o}C durchgeführt. Die Filter wurden zweimal je 30 Minuten bei Raumtemperatur in 3x SSC mit 0.5% Sarcosyl, dann zweimal je 30 Minuten mit 3x SSC gewaschen, unter einer Infrarotlampe getrocknet und über Nacht bei -80 ^{o}C autoradiographiert.

5.2.3.3. Plasmidpräparation

Zur Vermehrung von Plasmid DNA wurde eine E.coli Kolonie mit dem gewünschten Plasmid (zum Beispiel p550) in einer 100 ml Übernachtkultur von Luria Medium mit Antibiotikum (zum Beispiel 25 µg/ml Ampicillin) herangezogen. Am nächsten Morgen wurden vier 600 ml Kulturen durch 1:100 Verdünnung der Übernachtkulturen angesetzt. Die optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge wurde verfolgt. Als die Kulturen eine

OD von 1.0 erreicht hatten, wurde Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 250 µg/ml zugegeben, um das Verhältnis von Plasmid DNA zu chromosomaler DNA zu verbessern (74). Hernach wurde Plasmid DNA präpariert (111). Die Zellen wurden abzentrifugiert, durch eine Behandlung von zuerst Lysozym, dann Triton X100 wurden die Zellen lysiert. Nach einer Zentrifugation von einer Stunde bei 30000 Upm blieb das Plasmid im klaren Überstand. Verunreinigende RNA wurde durch Ribonuklease abgebaut, Proteine durch Phenol oder Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) mehrfach extrahiert und die DNA wiederholt alkoholgefällt.

5.2.3.4. Alkoholfällung (112)

Eine Standardmethode wurde für Fällungen von DNA oder RNA verwendet : Die Nukleinsäurelösung in Wasser oder stark verdünnter Salzlösung wurde mit 3 M Natriumacetat pH 5 auf 300 mM Natriumacetat gebracht. Zweieinhalb Volumenteile von Äthanol (-20 °C) wurden zugesetzt und enweder eine Stunde im Alkohol- Trockeneisbad oder über Nacht bei -20 °C gekühlt. Der Niederschlag wurde eine Stunde bei 4 °C und 5000 Upm abzentrifugiert, mit 80% Äthanol gewaschen , nochmals 5 Minuten bei 5000 Upm abzentrifugiert , lyophilisiert und in Wasser oder TE- Puffer aufgenommen.

5.2.3.5. Plasmidreinigung durch CsCl- Gradienten (113)

Um Plasmid DNA von chromosomaler DNA aus E.coli abzutrennen, wurde die DNA der Plasmidpräparation in 15 g 50% CsCl (w/w) mit 8 mg Ethidiumbromid gelöst und im

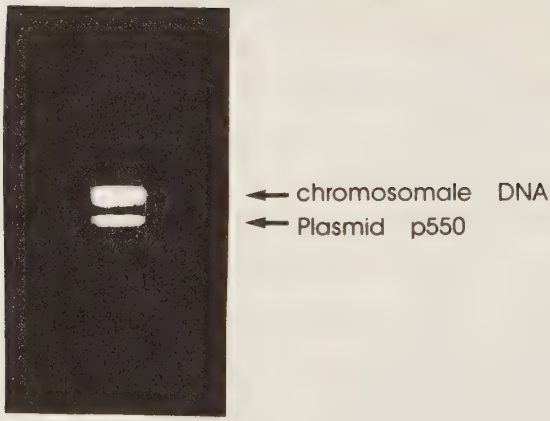


Abb. 27: CsCl- Gradientenzentrifugation zur Reinigung des Plasmids p550 von chromosomaler DNA aus E. coli

Beckman SW 41 Rotor 48 Stunden bei 36000 Upm und 20 °C zentrifugiert. Die Banden wurden im Dunkeln mit UV A sichtbar gemacht (Abb. 27) und die untere (Plasmid-) Bande durch Punktieren des Plastikzentrifugenröhrchens gewonnen und sofort mehrfach mit CsCl gesättigtem Isopropanol extrahiert, danach viermal gegen 10 mM Tris 1mM EDTA pH 7.5 dialysiert und alkoholgefällt. Die Ausbeute lag etwa bei 30-40 % der eingesetzten DNA.

5.2.3.6. Gewinnung von radioaktiv markierten Fragmenten

Zur DNA- Sequenzierung gereinigte Plasmid DNA (25 µg pro Ansatz) wurde in einer 50 µl Reaktion entweder mit Eco RI oder mit der Kombination Bam HI Hind III 4 Stunden bei 37 °C gespalten. Die DNA- Bruchstücke wurden phenolextrahiert und

alkoholgefällt. Die entstandenen 5'- Enden der DNA wurden nach folgender Vorschrift mit ^{32}P- Phosphatgruppen markiert (114, 115). Die DNA wurde in einem 70 µl Volumen von 5 mM Tris/HCl, 2 mM Magnesiumchlorid pH 8 eine Stunde bei 37 °C mit 0.2 U von alkalischer Phosphatase (vom Kalb) inkubiert, um endständige Phosphatgruppen abzuspalten. Das Enzym wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 70 °C denaturiert. Nach zehn Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung auf 10 mM Tris/HCl, 0.01 mM EDTA, 0.1 mM Spermidin pH 9.5 gebracht und die DNA zwei Minuten bei 90-100 °C denaturiert und sofort danach auf Eis gestellt.

400 uCi (γ -^{32}P) ATP wurden zugegeben und der Puffer auf 50 mM Tris/HCl, 10 mM Magnesiumchlorid, 8 mM DTT, 5% Glycerin pH 9.5 gebracht. Dann wurde die Mischung mit 20 U Polynukleotidkinase (aus T4 Phagen) 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit EDTA gestoppt und das Protein mit Phenol extrahiert unter Zugabe von 10 µg tRNA als Träger. Über eine Sephadex G50 Säule (0.7 x 20 cm, Laufpuffer TE- Puffer) wurden die freien Nukleotide von der markierten DNA abgetrennt. Der Frontpeak mit der markierten DNA wurde mit weiteren 10 µg Träger alkoholgefällt. Es ergab sich eine Ausbeute von ca. 10^6 cpm pro µg eingesetzter DNA.

5.2.3.7. Isolierung radioaktiv markierter DNA-Fragmente

Die radioaktiv markierte DNA wurde auf einem 8%igen Polyacrylamidgel unter Verwendung von einem Tris/ Boratpuffer als Laufpuffer getrennt (106). Die Banden wurden durch zehnminütige Autoradiographie identifiziert,

ausgeschnitten und mit einem Plastikspritzenstempel zu einer homogenen Paste zerdrückt. Aus dieser Paste wurden durch Elution mit einem Ammoniumacetatpuffer und nachfolgender Alkoholfällung die markierten DNA- Fragmente isoliert (92).

5.2.3.8. DNA- Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (92, 116)

Die Methode der DNA- Sequenzierung wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal in dieser Abteilung angewandt (1979). Deshalb mußten die optimalen Bedingungen für die chemischen Reaktionen mit den neu bestellten Reagenzien ermittelt werden.

Vorversuche hatten gezeigt, daß die Bedingungen etwas stärker als im Versuchsprotokoll von Maxam und Gilbert (92) gewählt werden mußten. Am deutlichsten galt dies für die Säuredepurinierung mit Pyridiniumformiat. Abb. 28 zeigt ein 20% Acrylamidharnstoffgel von einem radioaktiv markierten DNA- Fragment, das nur der G+A- Reaktion unterworfen wurde. Bahn 1 zeigt die Produkte für eine Reaktionstemperatur von 23 ^{o}C, Bahn 2 für 25 ^{o}C und Bahn 3 für 37 ^{o}C bei je einer Stunde Reaktionsdauer. Die Abbildung zeigt, daß die beiden niedrigen Temperaturen nicht genügen, es bilden sich nicht genügend kleine Fragmente. Die Reaktion bei 37 ^{o}C und einer Stunde Reaktionszeit zeigt genügend kleine Fragmente, sie ist andererseits schon zu stark, weil zu wenig große Fragmente übrigbleiben. Für die DNA-

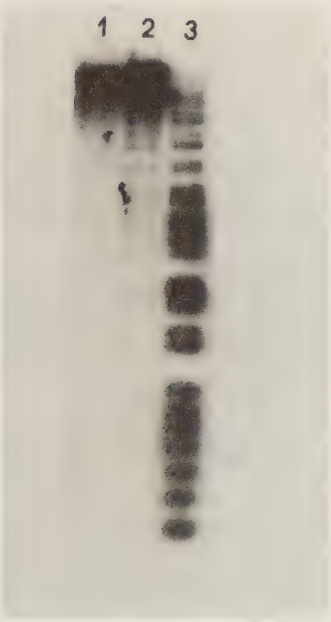


Abb. 28: Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Säuredepurinierung nach Maxam und Gilbert

1: 23°C, 1 Stunde Reaktionszeit

2: 25°C, 1 Stunde Reaktionszeit

3: 37°C, 1 Stunde Reaktionszeit

Für die Sequenzierung wurden 37°C und 30 Minuten Reaktionsgewählt.

Sequenzierung wurde deshalb die Reaktionszeit der A+G-Reaktion bei 37 °C auf 30 Minuten halbiert. Tabelle 4 zeigt die endgültigen Bedingungen für die Maxam- Gilbert-Reaktionen, wie sie bei der DNA- Sequenzierung verwendet wurden.

Reaktion	Bedingungen nach Maxam und Gilbert		Tatsächlich angewandte Bedingungen	
G	23 °C	5 min	23 °C	13 min
G + A	23 °c	60-80 min	37 °C	30 min
A > C	90 °C	10 min	90 °C	10 min
C + T	23 °C	5 min	23 °C	18 min
C	23 °C	5 min	23 °C	22 min

Tab. 4: Bedingungen der DNA- Sequenzreaktionen

Zur Auftrennung der Spaltprodukte wurden Harnstoff-Acrylamidgele der Größe 20 x 40 x 0.03 cm verwendet, die nach der Originalvorschrift von Maxam und Gilbert hergestellt wurden. Gele mit 20 % Acrylamid wurden zur Trennung der kurzen Fragmente verwendet und bei 1400V elektrophoretisiert. 10%ige Gele wurden zur Trennung der längeren Fragmente verwendet und bei 800V elektrophoretisiert. Bei der kürzesten Elektrophorese wanderte das Bromphenolblau ein Drittel der Strecke bis zum unteren Rand des Gels. Der mittellange Lauf wurde gestoppt, als das Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Der lange Lauf wurde beendet, wenn das Xylencyanol bis unten gewandert war. Die Gele wurden hernach bei -70 °C autoradiographiert.

Die Sequenzen wurden zweimal im Abstand von einigen Tagen, danach nochmals von einer unabhängigen Person gelesen. Die Nukleotidsequenzen wurden von Hand nach dem

genetischen Code in Aminosäuresequenzen übersetzt.

5.2.3.9. DNA-RNA Hybridisierung in flüssiger Phase

Zur Bestimmung der Orientierung der codierenden Sequenz von p550 cDNA wurden 5'- endmarkierte Fragmente des p550 Inserts mit Gesamt-RNA aus Chondrocyten hybridisiert (88). Je 4 µg RNA aus frisch isolierten Chondrocyten (siehe 5.2.2.1.) wurden im Eppendorfgefäß lyophilisiert. Dazu wurden je 5000 cpm von cDNA Fragmenten in 15 µl von 80% Formamid, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA , 40 mM Hepes pH 6 gegeben. Ein Fragment war das 150 bp Eco RI Hind III Fragment. Das andere Fragment war das 400 bp Eco RI Bam HI Fragment. Beide Fragmente waren an der Eco RI Spaltstelle 5'- endmarkiert. Der Ansatz wurde zum Denaturieren der DNA 10 Minuten auf 60 ^{o}C erwärmt und dann 20 Stunden bei 48 ^{o}C hybridisiert.

5.2.3.10 S1- Nukleaseabbau

Durch die Hybridisierung mit mRNA kann nur der Strang der cDNA vor S1 Nukleaseabbau geschützt werden, der bei der Transkription abgelesen wird. Deshalb wurde der Hybridisierungsansatz von 5.2.3.9. selekiv mit S1 Nuklease abgebaut (88): Die Hybridisierungsmischung wurde zu o.1 ml S1 Puffer (250 mM NaCl, 30 mM Natriumacetat, 1mM Zinksulfat pH 4.5) gegeben,die 1.5 µg denaturierte Lachsspermien-DNA und 55 U von S1 Nuklease enthielten. Der Ansatz wurde 40 Minuten bei 30 ^{o}C inkubiert, phenolextrahiert und alkoholgefällt wie beschrieben. Die alkoholgefällten Proben wurden auf einem 8%

Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographiert (4 Tage bei -70 °C).

5.2.3.11. Vergleich der gefundenen DNA Sequenz

mit Nukleinsäuresequenzen aus einer Datenbank

Die nach der Maxam Gilbert Methode gewonnenen DNA-Sequenzen wurden nach (117) mit der Dayhoff Datenbank für Nucleinsäuresequenzen verglichen. Dazu wurde die Sequenz in 40bp Bruchstücke eingeteilt und diese wurden mit den im Dayhoff Atlas (118) aufgeführten Nukleinsäuresequenzen (nichtviralen und nichtbakteriellen Ursprungs) mit Hilfe des "Search"- Programmes verglichen. Das Programm lieferte eine große Zahl von Sequenzen, die der p550 Sequenz ähnlich waren. Diese wurden mit Hilfe eines einfachen Fortran Programms in eine Liste sortiert. Aus dieser wurden die 206 Sequenzen ausgewählt, die mindestens vier zu p550 verwandte Fragmente besaßen. Diese Liste wurde durch ein vereinfachtes "Relate" Programm überprüft und 171 sicher insignifikante Eintragungen (SD Score < 4.0) wurden gestrichen. Der Rest der Eintragungen wurde dann mit einem ungekürzten Relate Programm mit der p550 Sequenz verglichen.

5.2.3.12. Sequenzvergleich auf der Proteinebene

Um die Information der bekannten Aminosäuresequenzen auszunutzen,wurden die p550 Sequenzen in allen möglichen Leserahmen in Proteinsequenzen übersetzt. Die Stopcodons wurden als Aminosäure X gelesen, um alle Fehlermöglichkeiten auszuschließen. Dann wurden die erhaltenen Sequenzen in

30-AS Fragmente unterteilt und ebenfalls mit dem "Search" Programm mit den Daten aus dem Dayhoff Atlas für Proteinsequenzen (119) verglichen. Da die erhaltenen Daten ebenfalls recht umfangreich waren, wurden alle Verwandschaften zu anderen Proteinen in eine alphabetische Liste sortiert. Aus dieser Liste wurden dann alle Zufallstreffer aussortiert. Der Rest der Verwandtschaften wurde nochmals mit dem "Relate" Programm überprüft.

Abkürzungen

BrdUrd:	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSE-Puffer:	50 mM Borsäure, 5 mM Natriumtetraborat, 10 mM Natriumsulfat, 1 mM EDTA
DBM:	diazobenzyloxymethyl
EDTA:	Äthylendiamintetraessigsäure (Dinatriumsalz)
NBPC:	Nitrobenzyloxymethylpyridiniumchlorid
odT:	Oligodeoxythymin
PBS	" phosphate buffered saline" 135 mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.4 mM Na_2HPO_4, 1.5 mM KH_2PO_4
SDS:	Natriumdodecylsulfat
TE-Puffer:	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5

6. Literatur

(1) K. A. Piez in G. N. Ramachandran, A. H. Reddi (Hrsg.), Biochemistry of Collagen, Plenum Press, New York, 1 - 45 (1976)

(2) P. P. Fietzek, K. Kühn, Int. Rev. of Conn. Tissue Res., 7, 1 - 60 (1976)

(3) D. J. Prockop, K. I. Kivirikko, L. Tuderman und N. A. Guzman, New Engl. J. Med., 301, 13 - 23 (1979)

(4) B. Peterkowsky und R. Diegelmann, Biochemistry, 10, 988 - 994 (1971)

(5) G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan in G. N. Ramachandran, A. H. Reddi (Hrsg.), Biochemistry of Collagen, Plenum Press, New York, 45 - 84 (1976)

(6) P. P. Fietzek und K. Kühn, Mol. and Cell. Biochem., 8, 141 - 157 (1975)

(7) J. Trus und K. A. Piez, J. Mol. Biol., 108, 705 - 732 (1976)

(8) D. J. Prockop, R. A. Berg, K. I. Kivirikko und R. Uitto in G. N. Ramachandran, A. H. Reddi (Hrsg.), Biochemistry of Collagen, Plenum Press, New York, 163 - 273 (1976)

(9) R. D. Palmiter, J. M. Davidson, J. Gagnon, D. W. Rowe,

P. Bornstein, J. Biol. Chem. 254, 1433 - 1436 (1979)

(10) K. I. Kivirikko, L. Risteli, Med. Biol. 54, 159 - 186 (1976)

(11) G. J. Cardinale, S. Udenfriend, Adv. Enzymol. 41, 245 - 300 (1974)

(12) R. Myllylä, L. Tuderman, K. I. Kivirikko, Eur. J. Biochem., 80, 349 - 357 (1977)

(13) T. M. Turpeenniemi, U. Puistola, H. Anttinen, Biochim. Biophys. Acta, 483, 215 - 219 (1977)

(14) K. I. Kivirikko, R. Myllylä, Int. Rev. Conn. Tissue Res. 8, 23 - 72 (1979)

(15) R. Myllylä, H. Anttinen, L. Risteli, Biochem. Biophys. Acta, 480, 113 -121 (1977)

(16) R. Harwood, M. E. Grant, D. S. Jackson, Biochem. J., 157, 291 - 302 (1975)

(17) L. Tuderman, K. I. Kivirikko, D. J. Prockop, Biochemistry, 17, 2948 -2954 (1978)

(18) M. K. K. Leung, L. I. Fessler, D. B. Greenberg , J. Biol. Chem., 254, 224 - 232 (1979)

(19) S. A. Jimenez, R. I. Bashey, M. Benditt, Biochem. Biophys. Res. Commun., 182, 33 - 41 (1977)

(20) L. Moro, B. D. Smith, Arch. Biochem. Biophys., 182, 33 - 41 (1977)

(21) P. D. Benya, S. R. Padilla, M. E. Nimni, Biochemistry 16, 865 - 872 (1977)

(22) R. Mayne, M. S. Vail, P. M. Mayne und E. J. Miller, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1674 - 1678 (1976)

(23) K. von der Mark, H. von der Mark, R. Timpl, Dev. Biol., 59, 75 - 85 (1977)

(24) T. F. Linsenmayer, G. N. Smith und E. D. Hay, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 39 -43 (1977)

(25) E. J. Miller, Mol. Cell. Biochem., 13, 165 - 192 (1976)

(26) I. Oberbäumer, H. Wiedemann, R. Timpl und K. Kühn, EMBO J. 1, 805 - 810 (1982)

(27) K. Kühn, H. Wiedemann, R. Timpl, J. Risteli, H. Dieringer, T. Voss und R. W. Glanville, FEBS Lett. 125, 123 - 128 (1981)

(28) K. von der Mark, Int. Rev. Conn. Tissue Res., 9, 265 - 324 (1981)

(29) H. Bentz, H. P. Bächinger, R. Glanville und K. Kühn, Eur. J. Biochem. 92, 563 - 567 (1978)

(30) E. Odermatt, J. Risteli, V. van Delden und R. Timpl, Biochem. J., 211, 295 - 302 (1983)

(31) H. Furthmayr, H. Wiedemann, R. Timpl, E. Odermatt und J. Engel, Biochem. J. 211, 303 - 311 (1983)

(32) R. R. Porter und K. B. M. Reid, Nature, 275, 699 -704 (1978)

(33) T. L. Rosenberry, J. M. Richardson, Biochemistry, 16, 3550 - 3558 (1977)

(34) R. Breathnach und P. Chambon, Ann. Rev. Biochem., 50, 349 - 383 (1981)

(35) H. Ohkubo, G. Vogeli, M. Mudryj, V. E. Avvedimento, M. Sullivan, I. Pastan und B. de Crombrugghe, Proc Natl. Acad. Sci. USA 77, 7059 -7063 (1980)

(36) Y. Yamada, V. E. Avvedimento, M. Mudryj, H. Ohkubo, G. Vogeli, M. Irani, I. Pastan und B. de Crombrugghe, Cell, 22, 887 - 892 (1980)

(37) E. H. Weiss, K. S. E. Cheah, Frank. G. Grosveld, H. H. M. Dahl, E. Solomon und R. A. Flavell, Nucl. Acid Res. 10, 1981 - 1994 (1982)

(38) J. M. Monson, B. J. McCarthy, Recombinant DNA, 1 (1981)

(39) S. W. Emmons, M. R. Klass und D. Hirsh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1333 - 1337 (1979)

(40) J. M. Monson, J. Natzle, J. Friedman und B. J. McCarthy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1761 - 1765 (1982)

(41) H. Leonhardt, Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, Thieme, Stuttgart, 1974

(42) P. Dehm und D. J. Prockop, Eur. J. Biochem., 35, 159 - 166 (1973)

(43) B. M. Vertel und A. Dorfman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1261 -1264 (1979)

(44) C. A. Reese und R. Mayne, Biochemistry, 20, 5443 - 5448 (1981)

(45) R. E. Burgeson und D. W. Hollister, Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 1124 - 1131 (1979)

(46) C. A. Reese, H. Wiedemann, K. Kühn und R. Mayne, Biochemistry, 21, 826 - 830 (1982)

(47) S. Chako, H. Holtzer, J. Cell. Biol., 28, 473 -487 (1966)

(48) J. M. Seyer und W. C. Vinson, Biochem. Biophys. Res. Comm., 58, 272 - 279 (1974)

(49) M. Duchêne, S. Wiedebusch, K. Kühn und P. K. Müller, FEBS Lett., 135, 119 - 122 (1981)

(50) K. von der Mark, V. Gauss, H. von der Mark, P. K. Müller, Nature, 267, 531 - 532 (1977)

(51) Dissertation V. Gauss, Universität München, 1979

(52) P. D. Benya, S. R. Padilla, M. E. Nimni, Biochemistry, 16, 865 - 871 (1977)

(53) M. Pacifici, S. A. Fellini, H. Holtzer und S. DeLuca, J. Biol. Chem. 256, 1029 - 1037 (1981)

(54) S. Inerot, D. Heinegard, L. Audell und S. E. Olsson, Biochem. J. , 169, 143 -156 (1978)

(55) M. Takigawa, H. Ishida, T. Takano und F. Suzuki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1481 -1485 (1980)

(56) H. Holtzer, J. Abbott, J. Lash und S. Holtzer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 46, 1533- 1542 (1960)

(57) H. G. Coon und R. D. Cahn, Science, 153, 1116 - 1119 (1966)

(58) J. Abbott, H. Holtzer Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59, 1145 - 1151 (1968)

(59) C. M. West, R. Lanza, J. Rosenbloom, M. Lowe und H. Holtzer, Cell, 17, 491 - 501 (1979)

(60) P. K. Müller, C. Lemmen, S. Gay, V. Gauss und K. Kühn, Exp. Cell Res. 108, 47 - 55 (1977)

(61) V. Gauss und P. K. Müller, Biochim. Biophys. Acta, 652, 39 - 47 (1981)

(62) W. Sandritter, G. Beneke, Allgemeine Pathologie, Schattauer, Stuttgart, 1974

(63) P. K. Müller, K. Kühn, Acta Rhum. Belg., 1, 23 - 35 (1977)

(64) D. J. Weatherall, J. B. Clegg, Cell, 12, 467 -479 (1979)

(65) D. J. Weatherall in J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden,

D. S. Fredrickson (Hrsg.) The Metabolic Basis of Inherited Disease, Mc. Graw Hill, 1508 - 1523 (1978)

(66) M. Busslinger, N. Moschenas, R. A. Flavell, Cell, 27, 289 - 298 (1981)

(67) H. Green, G. J. Todaro und B. Goldberg, Nature, 209, 916 - 917 (1966)

(68) W. Levinson, R. S. Bhatnagar und T. Tiu, J. Natl. Canc. Inst., 55, 807 - 810 (1975)

(69) S. L. Adams, M. E. Sobel, B. H. Howard, K. Olden, K. M. Yamada, B. de Crombrugghe und I. Pastan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3399 - 3403 (1977)

(70) B. H. Howard, S. L. Adams, M. E. Sobel, I. Pastan und B. de Crombrugghe, J. Biol. Chem., 253, 5869 - 5874 (1978)

(71) D. W. Rowe, R. C. Moen, J. M. Davidson, P. H. Byers, P. Bornstein und R. D. Palmiter, Biochemistry, 17, 1581 - 1590 (1978)

(72) S. L. Adams, J. C. Alwine, B. de Crombrugghe und I. Pastan, J. Biol. Chem., 254, 4935 - 4938 (1979)

(73) S. Sandmeyer, R. Smith, D. Kiehn und P. Bornstein, Cancer Res. 41, 830 - 838 (1981)

(74) C. McKeon, H. Ohkubo, I. Pastan und B. de Crombrugghe, Cell, 29, 203 - 210 (1982)

(75) M. I. Parker, K. Judge und W. Gevers, Nucl. Acid Res., 10, 5879 - 5891 (1982)

(76) P. K. Müller, E. Kirsch, V. Gauss - Müller und T. Krieg, Mol. Cell. Biochem., 34, 73 - 85 (1981)

(77) A. Lenaers, M. Ansay, B. V. Nusgens und C. M. Lapiere, Eur. J. Biochem. 23, 533 - 543 (1971)

(78) U. Becker, R. Timpl, O. Helle und D. J. Prockop, Biochemistry, 15, 2853 - 2862 (1976)

(79) T. Krieg, D. Hörlein, M. Wiestner und P. K. Müller, Arch. Dermatol. Res., 263, 171 - 175 (1978)

(80) M. Wiestner, T. Krieg, D. Hörlein, R. W. Glanville, P. Fietzek und P. K. Müller, J. Biol. Chem. 254, 7016 - 7019 (1979)

(81) J. R. Lichtenstein, G. R. Martin, D. Kahn, P. H. Byers und V. A. Mc Kusick, Science, 182, 298 - 300 (1973)

(82) L. Paglia, J. Wilczek, L. Diaz de Leon, G. R. Martin, D. Hörlein und P. K. Müller, Biochemistry, 18, 5030 - 5034 (1979)

(83) L. Paglia, M. Wiestner, M. Duchêne, D. Hörlein, L. Ouellette, G. R. Martin, P. K. Müller, Biochemistry, 20, 3523 - 3527 (1981)

(84) P. J. Pawlowski, G. T. Brierly, L. N. Lukens, J. Biol. Chem., 256, 7695 - 7698 (1981)

(85) J. C. Alwine, D. J. Kemp, G. R. Stark, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5350 - 5354 (1977)

(86) T. Yamamoto, M. E. Sobel, S. L. Adams, V. E. Avvedimento, R. di Lauro, I. Pastan, B. de Crombrugghe, A. Showalter, D. Pesciotta, P. Fietzek, B. Olsen, J. Biol. Chem., 258, 2612 - 2615 (1980)

(87) M. E. Sobel, T. Yamamoto, S. L. Adams, R. di Lauro, V. E. Avvedimento, B. de Crombrugghe, I. Pastan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5846 - 5850 (1978)

(88) N. Mantei, M. Schwarzstein, M. Streuli, S. Panem, S. Nagata und C. Weissmann, Gene, 10, 1 - 10 (1980)

(89) F. Payvar und R. T. Schimke, J. Biol. Chem., 254, 7636 - 7642 (1979)

(90) L. A. Weber, E. D. Hickley, P. A. Maroney, C. Baglioni J. Biol. Chem., 252, 4007 - 4010 (1977)

(91) D. Hörlein, P. P. Fietzek, E. Wachter, C. M. Lapiere, und K. Kühn, Eur. J. Biochem., 99, 31 - 38 (1979)

(92) A. M. Maxam und W. Gilbert, Sequencing DNA by Labeling the End and Breaking at Bases, DNA - Segments, End Labels, Cleavage Reactions, Polyacrylamide Gels and Strategies , Harvard University, Cambridge Mass. USA (1979)

(93) J. G. Sutcliffe, Nucl. Acid. Res. 5, 2721 - 2728 (1978)

(94) H. Ohmori, J. I. Tomizawa und A. M. Maxam, Nucl. Acid. Res. 5, 1479 - 1485 (1978)

(95) F. Fuller und H. Boedgker, Biochemistry, 20, 996 - 1006 (1981)

(96) D. J. Prockop, K. I. Kivirikko, L. Tuderman, N. A. Guzman, New. Engl. J. Med., 301, 77 - 85 (1979)

(97) K. A. Piez, E. A. Eigner, M. S. Lewis, Biochemistry, 2, 58 - 66 (1963)

(98) D. L. Layman, E. B. McGoodwin, G. R. Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 454 - 458 (1971)

(99) B. F. Pontz, P. K. Müller, N. N. Meigel, J. Biol. Chem., 248, 7558 - 7564 (1973)

(100)R. A. Cox in Methods in Enzymology, L. Grosman, K. Moldave (Hrsg.) Acad. Press, New York, Band XII B , 120 -129 (1967)

(101)H. Aviv und P. Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1408 - 1412 (1972)

(102)J. M. Rosen, S. L. C. Woo und J. P. Comstock, Biochemistry, 14, 2895 - 2903 (1975)

(103)J. M. Monson und M. Goodman, Biochemistry, 17, 5122 - 5127 (1978)

(104)U. K. Laemmli, Nature, 227, 680 - 685 (1970)

(105)W. M. Bonner und R. A. Laskey, Eur. J. Biochem., 46, 83

- 88 (1974)

(106)A. C. Peacock und C. W. Dingman, Biochemistry, 6, 1818 - 1827 (1967)

(107)T. Maniatis, A. Jeffrey und D. G. Kleid, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1184 - 1188 (1975)

(108)S. N. Cohen, A. C. Y. Chang und L. Hsu, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 - 2114 (1972)

(109)M. Grunstein, D. S. Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961 - 3965 (1975)

(110)Labormethode A. J. Jeffreys, R. A. Flavell (noch nicht publiziert)

(111)F. Bolivar und K. Backman, Methods in Enzymology, Band 68 R. Wu (Hrsg.) 245 - 280 (1979)

(112)J. Marmur, J. Mol. Biol., 3, 208 - 218 (1961)

(113)M. Meselson, F. W. Stahl und J. Vinograd, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 43, 581 - 588 (1957)

(114)C. C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54, 158 - 165 (1965)

(115)J. R. Lillehaug, R. K. Kleppe und K. Kleppe, Biochemistry, 15, 1858 - 1865 (1976)

(116)A. M. Maxam und W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560 - 564 (1977)

(117)M. O. Dayhoff, R. M. Schwartz, H. R. Chen, W. C. Barker, L. T. Hunt und B. C. Orcutt, DNA, 1, 51 - 58 (1981)

(118)Nucleic Acid Sequence Database, Version 16, 1982, M. O. Dayhoff, H. R. Chen, L. T. Hunt, W. C. Barker, L. S. Yeh, D. G. George und B. C. Orcutt, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA

(119)Protein Sequence Database, Version 5, 1982, M. O. Dayhoff, L. T. Hunt, W. C. Barker, B. C. Orcutt, L. S. Yeh, H. R. Chen, D. G. George, M. C. Blomquist und G. C. Johnson, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA

(120)E. J. Miller und S. Gay in Methods in Enzymology, Cunningham und Frederiksen (Hrsg.), Acad. Press, New York, 3 - 32 (1982)

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Kühn für die wissenschaftliche Betreuung und großzügige Förderung dieser Arbeit. Herrn Dr. Peter Müller sei gedankt für die Stellung des Themas, die engagierte praktische Betreuung der Arbeit und viele fruchtbare Ratschläge. Ferner danke ich allen Kollegen der Abteilung Kühn für ihre Hilfe und für das positive Arbeitsklima.

Außerhalb unserer Abteilung danke ich Frau Dr. Kahmann, Herrn Dr. Kamp und Herrn Dr. Priess für wertvolle wissenschaftliche Diskussionen, Herrn Förtsch für die Hilfe bei der Computersuche nach Sequenzen, die zur p550 Sequenz verwandt sind, Herrn Berger für die Hilfe bei der graphischen Ausführung der Abbildungen und Herrn Nagel und seiner Abteilung für die Durchführung der photographischen Arbeiten.

Lebenslauf

5. März 1953 geboren in Wörth am Main als Sohn von Dipl.Ing. Bernhard Duchene und seiner Frau Anita Duchene geb. Ditmer

1959 Eintritt in die katholische Volksschule in Immenstadt im Allgäu

1963 Eintritt ins Gymnasium der Klosterschule Maria Stern in Immenstadt

1965 Eintritt ins Gymnasium Oberstdorf

1969 - 1970 Ein Jahr im Schüleraustausch in Palmerton Pennsylvanien, USA

1972 Abitur am Gymnasium Oberstdorf

1972 - 1974 Studium der Chemie an der Universität Freiburg mit Vordiplom

1974 - 1975 Ein Jahr Studium der Chemie an der University of Southampton, England

ab 1975 an der Universität München

1979 Abschluß des Diploms der Chemie

1979 - 1983 Doktorarbeit am Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried

Veröffentlichungen

(121)Crystal and molecular structure of quinolinium trichlorodimethylstannate (IV).

A. J. Buttenshaw, M. Duchêne, M. Webster, J. Chem. Soc., Dalton Trans. 2230 - 2232 (1975)

(122)Structures of some fluorinated pyridines from the analysis of NMR spectra of nematic solutions.

M. Duchêne, J. W. Emsley, J. C. Lindon, D. S. Stephenson, S. R. Salman, J. Magn. Reson., 22, 207 - 218 (1976)

(123)The molecular structure and reorientation of parafluorobenzaldehyde dissolved in a smectic mesophase studied using NMR spectroscopy.

M. Duchêne, J. W. Emsley, J. C. Lindon, J. Overstall, D. S. Stephenson, S. R. Salman, Mol. Phys., 33, 281 - 286 (1977)

(124)Endocytosis of sulfated proteoglycans by chicken chondrocytes.

K. von Figura, H. Mittelviefhaus, R. Prinz, M. Duchêne, T. Krieg, Biol. of Articular Cartilage in Health and Disease, Proceedings of Munich Symposium of Biol. of Conn. Tissue, H. Gastpar (Hrsg.) Schattauer, Stuttgart, 189 - 195 (1980)

(125)Effects of procollagen peptides on the translation of type II collagen messenger ribonucleic acid and on

collagen biosynthesis in chondrocytes.

L. M. Paglia, M. Wiestner, M. Duchêne, L. A. Ouellette, D. Hörlein, G. R. Martin und P. K. Müller, Biochemistry, 20, 3523 - 3527 (1981)

(126)In vitro synthesis and degradation of collagen by chick chondrocytes and fibroblasts.

M. Duchêne, S. Wiedebusch, K. Kühn und P. K. Müller, FEBS Lett., 135, 119 - 122 (1981)

(127)Levels of collagen mRNA in dedifferentiating chondrocytes.

M. Duchene, M. E. Sobel und P. K. Müller, Exp. Cell Res., 142, 317 - 324 (1982)